



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN TOSSICOLOGIA

Farmacologia e Farmacoterapia delle Tossicodipendenze

Ciclo XXVII

MECCANISMO D'AZIONE DEL PRAMIPEXOLO NELLA TERAPIA DELLA MALATTIA DI PARKINSON

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/14-FARMACOLOGIA

Presentata da:	Dott.ssa Elena Espa
Coordinatore Dottorato:	Prof. Gaetano Di Chiara
Relatore:	Prof. Gaetano Di Chiara
Tutor:	Dott. Sandro Fenu

Esame finale anno accademico 2013 – 2014

La malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa a carattere lentamente evolutivo, ampiamente diffusa, che compromette i movimenti e l'equilibrio. Rappresenta una delle più frequenti patologie neurologiche dell'età avanzata; infatti, viene generalmente diagnosticata in soggetti di età superiore ai 50 anni, e solo in minima percentuale in pazienti più giovani. La sua prima comparsa nella letteratura scientifica viene tradizionalmente riportata nell'anno 1817, quando il medico inglese James Parkinson nel suo celebre saggio "An Essay on Shaking Pulsy" la definisce "Paralisi agitante" e descrive, con dovizia di particolari, la storia clinica di sei pazienti affetti da tremore, diminuzione della forza muscolare, e con un particolare modo di camminare, a piccoli passi e con tendenza a inclinare il busto in avanti. La patologia prese poi il suo eponimo.

Epidemiologia

L'incidenza è relativamente bassa, colpisce circa lo 0.2-0.3% della popolazione mondiale, con percentuali che raggiungono l'1-2% negli individui con più di 55 anni, e il 3-5% quando l'età supera gli 85 anni (Silindir e Ozer, 2014) (Tabella 1). E' presente in tutto il mondo senza differenze tra etnie e colpisce più di 6 milioni di individui (www.epda.eu.com).

Tabella 1. Epidemiologia della Malattia di Parkinson (Connolly e Lang, 2014)

Età media di insorgenza (anni)	65
Uomo:donna	1.5:1
Incidenza (1000 soggetti/anno)	
Pazienti 55-65 anni	0.3
Pazienti ≥ 85 anni	4.4
Prevalenza (%)	
Popolazione totale	0.3
Pazienti > 60 anni	1
Idiopatica/ereditaria	90:10
Aspettativa di vita	Varia con l'età di insorgenza della patologia e dalla sua associazione alla demenza
Sottogruppi clinici (%)	
Tremore dominante	8
Acinesia-rigidità	26
Misto	66
Fattori protettivi per la patologia	Nicotina, alti consumi di caffè, elevati livelli sierici di acido urico
Fattori di rischio	Familiarità, esposizione a pesticidi, traumi cerebrali

Si stima che nei 15 paesi più popolosi al mondo, che rappresentano circa i 2/3 della popolazione mondiale, le persone affette da Parkinson, oscillano tra 4.1/4.6 milioni, un numero destinato ad aumentare; infatti, le previsioni indicano che nel 2030, le persone colpite dalla patologia potrebbero attestarsi intorno a 8.7/9.3 milioni di individui (Dorsey *et al.*, 2007).

In Italia, la malattia interessa circa il 2% della popolazione sopra i 65 anni. Da uno studio condotto dal centro di epidemiologia dell'Istituto Superiore di Sanità, si può rilevare che i casi nel nostro paese sono circa 220.000, rendendo il Parkinson la malattia neurodegenerativa più diffusa dopo l'Alzheimer (www.epicentro.iss.it). Sebbene non sia considerata una malattia genetica, il 15% degli individui affetti presenta un parente di primo grado con la stessa condizione. Dall'analisi dei dati ottenuti da studi epidemiologici si può affermare che la presenza di un parente prossimo affetto dalla patologia, aumenta dal 4 al 9% la probabilità di sviluppare il Parkinson rispetto alla popolazione generale (Samii *et al.*, 2004).

Eziologia

Allo stato attuale, l'eziologia è sconosciuta, tanto da essere definita come una condizione idiopatica. Si ritiene che più fattori contribuiscano ad aumentare il rischio di insorgenza, tra i quali invecchiamento, fattori genetici, fattori ambientali, danni cerebrali e virus (encefalite) (www.pdf.org). Infatti, si suppone che il Parkinson possa essere il risultato dell'esposizione ad alcune tossine ambientali. Studi epidemiologici hanno identificato diversi fattori che possono essere correlati ad esso, tra cui il consumo di acqua o cibo contaminato da pesticidi, erbicidi, insetticidi, rodenticidi e l'esposizione cronica a metalli come il manganese (de Lau e Breteler, 2006). Interessanti sono gli studi che mettono in evidenza la correlazione tra l'esposizione a pesticidi e determinate mutazioni geniche che predisporrebbero il soggetto allo sviluppo della patologia in caso di esposizione a queste sostanze. Finora gli studi sul legame tra pesticidi e Parkinson si sono basati su ricerche condotte in animali e studi epidemiologici, i quali hanno messo in evidenza un aumento del rischio di malattia tra gli agricoltori e, in generale, in chi è esposto ai prodotti chimici agricoli. Uno studio su cellule staminali ottenute a partire da cellule della pelle di pazienti che avevano una mutazione nel gene che codifica per l'alfa-sinucleina, che è un segno distintivo della malattia, ha messo in evidenza, per la prima volta, il legame fra la patologia e i pesticidi, nelle persone con una mutazione genetica specifica. In questi soggetti l'esposizione ai pesticidi aumenta la produzione di radicali liberi che causano la morte delle cellule dopaminergiche della sostanza nera mediante

danno mitocondriale, necrosi e/o apoptosi (Ryan *et al.*, 2013). L'associazione tra Parkinson, pesticidi e variabilità genetica, è stata anche la base di un interessante studio, in cui è stato messo in evidenza che, una variante allelica dell'aldeide deidrogenasi mitocondriale, potrebbe essere alla base dell'incremento di vulnerabilità verso alcuni pesticidi, in quanto essi sono capaci di inibire la funzionalità di questo enzima e quindi, in concomitanza alla loro esposizione, renderebbero il soggetto più vulnerabile allo sviluppo della malattia di Parkinson (Fitzmaurice *et al.*, 2014). Inoltre, a forte rischio è l'esposizione professionale agli esaclorocicloesani, utilizzati in passato come insetticidi, agli erbicidi come il paraquat (è interessante la similitudine della struttura chimica di questo erbicida con quella della neurotossina 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina, MPTP, ampiamente utilizzata per lo sviluppo di modelli animali di Parkinson nei roditori e nei primati non umani) e alle sostanze fungicide. Secondo i dati elaborati da Goldman *et al.* (2012), tra le sostanze organiche che aumentano il rischio di sviluppare la patologia in caso di prolungata esposizione vi sono il tricloroetilene, percloroetilene e il tetracloruro di carbonio. Non meno importanti risultano essere i danni cerebrali, ad esempio dovuti a traumi cranici, accompagnati da amnesia o perdita della memoria, in quanto associati ad un'aumentata probabilità di sviluppare il Parkinson (Stern, 1991). Alcuni scienziati hanno suggerito che l'infiammazione cerebrale possa condurre allo sviluppo della malattia, rendendo i pugili professionisti delle figure a rischio (www.pdf.org).

Si ritiene che numerosi meccanismi siano coinvolti nella degenerazione dei neuroni dopaminergici, tra cui lo stress ossidativo, l'alterazione dell'omeostasi del calcio, la deplezione di ATP, le alterazioni nel funzionamento della catena respiratoria mitocondriale e stati infiammatori.

Lo stress ossidativo è uno degli eventi cellulari considerato determinante nella patogenesi della malattia. Nella sostanza nera pars compacta di pazienti affetti da Parkinson è stato messo in evidenza un aumento della perossidazione lipidica e un aumento delle specie reattive dell'ossigeno. Si ritiene che la deplezione di enzimi deputati alla protezione cellulare come la superossido-dismutasi e la glutatione-perossidasi, in seguito a esposizione a tossine ambientali e al metabolismo endogeno della dopamina (DA) stessa, attuato dagli inibitori delle monoamminossidasi di tipo B e delle catecol-O-metiltransferasi, che porta alla formazione di specie reattive dell'ossigeno, contribuisca notevolmente nella genesi dello stress ossidativo cellulare (Olanow, 1990).

Le alterazioni a carico della catena respiratoria mitocondriale sono state oggetto di numerosi studi. In cervelli di individui affetti dalla patologia sono state evidenziate

anomalie a carico degli enzimi del complesso I della catena respiratoria mitocondriale, mostrando quanto le alterazioni mitocondriali possano giocare un ruolo importante nelle disfunzioni cellulari che conducono poi alla morte neuronale (Davie, 2008).

Segni e sintomi

La malattia di Parkinson è caratterizzata principalmente dalla degenerazione a carico del sistema dopaminergico mesostriatale, i cui neuroni, con i corpi cellulari nella pars compacta della sostanza nera, proiettano allo striato dove sono funzionalmente e anatomicamente connessi a due differenti tipi di neuroni GABAergici efferenti, i quali esprimono sia i recettori D₁ e contengono sostanza P e dinorfina (via diretta), sia i recettori D₂ che invece contengono encefalina (via indiretta) (Gerfen, 1992; Ferrè *et al.*, 1993, 1996).

I sintomi motori della patologia riflettono la degenerazione a carico di queste vie, con la via dopaminergica nigrostriatale maggiormente interessata dal danno, rispetto a quelle mesolimbica e mesocorticale. L'effetto primario della perdita neuronale nel caudato-putamen si traduce nella disregolazione dei processi alla base dell'integrazione senso-motoria dei movimenti volontari a livello dei gangli della base, corteccia motoria e del talamo (Obeso *et al.*, 2000). Inoltre, altri sistemi neurotrasmettitoriali come quello serotoninergico, noradrenergico e colinergico, in base della stadiazione della patologia, possono essere coinvolti e contribuire alla sintomatologia del Parkinson (Braak *et al.*, 2006). Nelle prime fasi della patologia, i sintomi e i segni osservabili colpiscono soprattutto la sfera motoria, mentre i disturbi cognitivi e la demenza si manifestano negli stadi avanzati (Hughes *et al.*, 1993). Sintomi non motori come iposmia, fatica, costipazione, disturbi del sonno (alterazioni del sonno REM) e depressione possono invece essere precedenti alla diagnosi (Connolly e Lang, 2014) (ulteriori dettagli sono riportati in Tabella 2). Tra i sintomi motori possiamo identificare quattro caratteristiche che vengono considerate come le basi sintomatologiche della malattia di Parkinson:

tremore a riposo, sintomo più evidente e comune, a bassa frequenza, interessa in modo particolare le mani, tende ad essere meno evidente durante l'esecuzione di movimenti volontari, è assente durante il sonno, e tende ad aumentare in situazioni di stress emozionale;

bradicinesia (lentezza nell'eseguire i movimenti), sintomo più invalidante nei primi stadi della malattia che interessa l'intero atto del movimento comprendendo pianificazione, iniziazione ed esecuzione. Esso è causa di numerosi problemi nello svolgimento delle semplici attività quotidiane come il vestirsi o lo scrivere;

rigidità muscolare dovuta ad una contrazione eccessiva e continua dei muscoli, la quale può essere associata a dolore articolare. Interessa in genere i muscoli del collo e delle spalle;

instabilità posturale, tipica delle ultime fasi, causa predominante di disturbi dell'equilibrio e della deambulazione la quale avviene sempre con piccoli passi strisciati e si conclude spesso con una caduta.

Tabella 2. Principali sintomi motori e non motori nel Parkinson (Connolly e Lang, 2014)

Caratteristiche	Tempo di insorgenza	Frequenza (%)
Sintomi motori primari		
Tremore a riposo	Alla diagnosi o dopo	~ 70 alla diagnosi
Bradicinesia	Alla diagnosi	Tutti
Rigidità	Alla diagnosi o dopo	~ 90
Sintomi non motori precoci		
Iposmia	Può precedere la diagnosi	25-97
Fatica	Può precedere la diagnosi	~ 60
Depressione	Può precedere la diagnosi	~ 25
Disturbi del sonno REM	Può precedere la diagnosi anche di 15 anni	~ 30
Costipazione	Può precedere la diagnosi	~ 30
Sintomi tardivi		
Sintomi assiali resistenti alla terapia	5-10 anni dopo insorgenza sintomi	
Freezing/instabilità posturale		~ 90 dopo 15 anni
Disfagia		~ 50 dopo 15 anni
Disturbi psichiatrici	5-10 anni dopo insorgenza sintomi	
Ansia		~ 55
Disturbi sistema autonomo	5-10 anni dopo insorgenza sintomi	
Ipotensione ortostatica		~ 15
Scialorrea		~ 30
Incontinenza		~ 35
Incontinenza notturna		~ 35
Disfunzioni sessuali		~ 20
Deficit cognitivi	Aumento probabilità in base al tempo di insorgenza dei sintomi	
Deficit moderati		35 alla diagnosi, 50 a 5 anni
Demenza		>80 a 20 anni dalla diagnosi

Negli stati iniziali della malattia i sintomi possono essere difficili da riconoscere e lo stesso paziente può tendere a trascurarli, considerandoli tipici dell'età (Jankovic, 2008).

Oltre ai sintomi motori, i pazienti parkinsoniani sviluppano una vasta gamma di disturbi non motori di natura psichiatrica e neurodegenerativa che contribuiscono notevolmente a compromettere la qualità della vita (Aarsland *et al.*, 2009). I sintomi neuropsichiatrici comprendono: demenza, caratterizzata da un progressivo deficit di attenzione (Bosboom *et al.*, 2004), depressione (58%), apatia (54%), ansia (49%), allucinazioni (44%), disturbi ossessivo-compulsivi quali alimentazione incontrollata, ipersessualità, gioco d'azzardo patologico, shopping compulsivo, punding. Si ritiene che queste manifestazioni sono associate alla sindrome da disregolazione dopaminergica, e sono dovute al trattamento della malattia che porta ad un eccesso di DA (Fenu *et al.*, 2009).

Ulteriori sintomi, non meno invalidanti, sono i disturbi del sonno, disfunzioni della vescica, ipotensione ortostatica, eccessiva sudorazione, costipazione, nausea, eccessiva salivazione, alterazioni della vista, secchezza degli occhi, sguardo fisso con riduzione dell'ammicciamento e retrazione palpebrale, movimenti rapidi e involontari degli occhi, parestesie, disturbi dell'olfatto (Jankovic, 2008).

La degenerazione dei neuroni dopaminergici della sostanza nera pars compacta, è associata alla formazione di inclusioni intracitoplasmatiche proteiche denominate “corpi di Lewy”, descritti per la prima volta nel 1912 da Friedrich Lewy. Teorie recenti indicano che il sistema di degradazione delle proteine ubiquitina-proteosoma sia coinvolto nella eziopatologia della malattia di Parkinson e che l'accumulo di proteine nel citosol, causato da una disfunzione di tale sistema, sia letale per la cellula. Dal punto di vista macroscopico, mediante colorazione con ematossilina-eosina, il corpo di Lewy appare come un corpo sferico eosinofilo, con una regione centrale densa. Alla microscopia elettronica appare localizzato in sede intracitoplasmatica. Esso può, tuttavia, riscontrarsi anche a livello extracellulare. La forma più comune è costituita da componenti granulari, prevalentemente nella regione centrale, e fibrillari nella periferia. Il maggior costituente del corpo di Lewy è l'alfa-sinucleina, proteina a basso peso molecolare, localizzata su terminali sinaptici della cellula neuronale. Altri elementi sono la subunità del proteosoma 26S, la parkina, la sinfilina-1, la proteina 14-3-3 (www.treccani.it).

La distribuzione anatomica dei corpi di Lewy è direttamente correlata al grado di sviluppo della malattia e alla severità dei sintomi clinici. Essi compaiono dapprima nel bulbo olfattivo, nel midollo allungato e nel tegmento pontino, quando i pazienti risultano

asintomatici. Con il progredire della malattia, si sviluppano nella sostanza nera, nelle aree del mesencefalo e prosencefalo basale e, nell'ultima fase, nella neocorteccia (Davie, 2008). La degenerazione dei neuroni dopaminergici può progredire sino a causare la perdita del 70-80% degli stessi dando luogo ad una massiccia riduzione della concentrazione di DA e di conseguenza ad uno scoordinamento motorio.

Terapia

Il target principale della farmacoterapia della malattia di Parkinson è rappresentato dai recettori dopaminergici, suddivisi in due superfamiglie che differiscono per la loro distribuzione e per gli effetti esplicati dai loro ligandi: la super famiglia D₁ (D₁ e D₅) associati a proteine G che promuovono l'attività dell'adenilato ciclasi, e la superfamiglia dei recettori D₂ (D₂, D₃ e D₄), i quali sono invece associati a proteine G che sopprimono l'attività dell'adenilato ciclasi (Neve *et al.*, 2004) (Tabella 3).

Tabella 3. I recettori dopaminergici, funzioni e localizzazione

Famiglia	Sottotipi	Funzione	Localizzazione
D ₁	D ₁ D ₅	Attivano l'adenilato ciclasi e stimolano la formazione di cAMP, aumentano l'attività della fosfolipasi C stimolando la formazione di IP ₃	Postsinaptici D _{1A} striato, talamo, ipotalamo e sistema limbico. D ₅ ippocampo e ipotalamo
D ₂	D ₂ D ₃ D ₄	Inibiscono l'attività dell'adenilato ciclasi riducendo la formazione di cAMP con conseguente apertura dei canali al K ⁺ e chiusura di quelli al Ca ²⁺	Sia post che pre sinaptici D ₂ striato, sostanza nera, ipofisi. D ₃ bulbo olfattivo, striato ventrale, ippocampo. D ₄ corteccia frontale, bulbo e mesencefalo.

Il trattamento d'elezione è basato sulla terapia dopaminergica sostitutiva, il Parkinson è stata la prima patologia neurologica degenerativa trattata con terapia sostitutiva. I sintomi del Parkinson compaiono quando i livelli di DA del putamen si riducono almeno dell'85%. La riduzione della DA endogena, dovuta alla degenerazione dei neuroni dopaminergici della sostanza nera può essere compensata dall'apporto esogeno di L-3,4-diidrossi-fenilalanina (levodopa) che, somministrata in associazione agli inibitori delle decarbossilasi periferiche (carbidopa e/o benserazide, in rapporto 1:4), viene convertita in DA e accumulata nei terminali residui del sistema nigro-striatale e dai neuroni non dopaminergici.

L'introduzione della levodopa, come trattamento d'elezione del Parkinson risale al 1967. Esso portò ad un miglioramento della qualità della vita dei pazienti, ma com'è noto, anche ad una serie di effetti collaterali associati al suo uso a lungo termine (Yahr, 1993). Infatti, dopo circa 5-8 anni di terapia cronica e continuativa, in un'alta percentuale di soggetti, compaiono gravi effetti collaterali quali fluttuazioni motorie e ipercinesie che richiedono una riformulazione della terapia in atto (nella Tabella 4 è riportata una classificazione oltre ad alcune caratteristiche delle discinesie).

Tabella 4. Classificazione delle discinesie (Marconi *et al.*, 1994)

Tipo	Caratteristiche e modalità di comparsa
Distonie del primo mattino, distonie del periodo off	Movimenti che compaiono ai piedi, spesso al mattino o al termine della notte. Spesso risvegliano i pazienti e vengono interpretati come crampi. Si tratta di movimenti lenti, che tendono a determinare una postura fissa dell'arto colpito, abitualmente sul lato dove sono più evidenti i segni parkinsoniani. Possono ricomparire, di giorno, durante i periodi di blocco motorio. Questi movimenti involontari tendono a scomparire dopo circa 30 minuti dall'assunzione di una dose di levodopa, mentre più raramente interessano altre parti del corpo.
Discinesie di picco-dose	Discinesie che si manifestano anche durante i periodi di beneficio clinico, in maniera più evidente nei soggetti con esordio precoce della malattia (< 50 anni), buona risposta alla levodopa e che presentano, come sintomi prevalenti, bradicinesia e rigidità. Sono dapprima interessate le estremità degli arti, con movimenti bruschi, semplici, poi le parti prossimali, infine il tronco e la faccia (corea). Con il tempo le discinesie si accentuano in durata, poi nell'intensità. Esse possono essere accentuate da prove di attivazione mentale, di calcolo o dal movimento volontario. Sono tanto più gravi quanto più elevati e intermittenti sono i dosaggi di levodopa assunti.
Distonie, discinesie bifasiche e movimenti ballici	Violente discinesie, con movimenti di torsione o rotazione degli arti e del tronco (distonie), nei periodi di transizione dalla fase di blocco al periodo di massimo beneficio clinico e alla fine di questo (discinesie bifasiche), oppure coinvolgono principalmente la radice degli arti (movimenti ballici), con intensità tale da poter stancare molto il paziente.

Allo scopo di ridurre gli effetti avversi della terapia, sono stati introdotti in terapia gli agonisti dei recettori dopaminergici, i quali, a differenza della levodopa, non necessitano di conversione metabolica e, se somministrati in associazione alla levodopa, permettono, sulla base di un effetto sinergico, la riduzione dei dosaggi della stessa (Goetz, 1990; Mireau e Schingnitz, 1992). La levodopa è efficace nel contrastare i disturbi motori negli stadi precoci della patologia, nei quali gli agonisti dopaminergici, seppur con pareri

contrastanti, hanno minore efficacia, e la loro associazione con la levodopa potrebbe ritardare lo sviluppo di discinesie (Clarke and Guttman 2002; Jenner, 2003; Rascol *et al.*, 1999). Diversamente dalla levodopa, le azioni degli agonisti non sono direttamente correlate alla degenerazione a livello nigrale, e non aumentano il metabolismo della DA. Inoltre, riducono il turn-over della DA con la conseguente minor produzione di radicali liberi potenzialmente neurotossici derivanti dalla sua auto-ossidazione che possono essere responsabili di una più veloce progressione della malattia (Figura 1).

Capostipite di questa classe di farmaci è stata la bromocriptina, già in commercio circa 30 anni fa (Teychenne *et al.*, 1975), seguita dalla lisuride, diidroergocriptina, pergolide (entrata nel mercato negli anni 80, Tanner *et al.*, 1987) e la cabergolina. Questi agonisti, appartenenti alla classe dei derivati dell'ergot, possono essere utilizzati come monoterapia nei primi stadi della patologia per diversi mesi (nel 20% dei pazienti circa) senza che si verifichi l'insorgenza di discinesie (Nakanishi *et al.*, 1992). Altri farmaci utilizzati in terapia sono l'apomorfina e derivati apomorfinici, fino ai nuovi preparati non ergolinici come il ropinirolo, rotigotina e pramipexolo, il quale sarà l'oggetto del nostro studio. Tutti questi farmaci hanno caratteristiche differenti, sia per quanto riguarda l'affinità recettoriale che per la durata di azione; tutti stimolano i recettori D₂, ma l'apomorfina e il pergolide stimolano anche i D₁, mentre il pramipexolo si distingue per la sua maggior affinità verso i D₃ rispetto ai D₂ (Brooks, 2000). Hanno emivita variabile, tuttavia sempre superiore a quella della levodopa, che varia dalle circa 5-6 ore della bromocriptina e ropinirolo alle 64 ore della cabergolina con possibilità per quest'ultima, che ha la più lunga durata d'azione, di un'unica somministrazione giornaliera. Gli studi preclinici mettono in evidenza le differenze tra vecchi (bromocriptina, cabergolina e pergolide) e nuovi (pramipexolo e ropinirolo) agonisti in termini di efficacia e tollerabilità, ma va sottolineato che non esistono studi prospettici di confronto diretto tra i vari farmaci. Pertanto, il paragone può avvenire solo con il confronto di trial che non sempre hanno lo stesso disegno sperimentale e la stessa durata di trattamento.

Altri farmaci utilizzati in terapia comprendono gli inibitori delle monoamminossidasi, selegilina e rasagalina, e delle catecol-O-metiltransferasi, entacapone e tolcapone, utilizzati allo scopo di incrementare la concentrazione di DA, riducendone il suo metabolismo (Fernandez e Chen, 2007); farmaci che agiscono sulla trasmissione glutammatergica come l'amantadina, utilizzati partendo dall'evidenza che alla perdita di DA è associata una iperattività glutammatergica, la quale a sua volta contribuisce alla comparsa dei sintomi motori che accompagnano la malattia (Johanson *et al.*, 2009); ed

infine farmaci che agiscono come antagonisti dei recettori colinergici muscarinici, come il triesifenidile, biperidene, metixene.

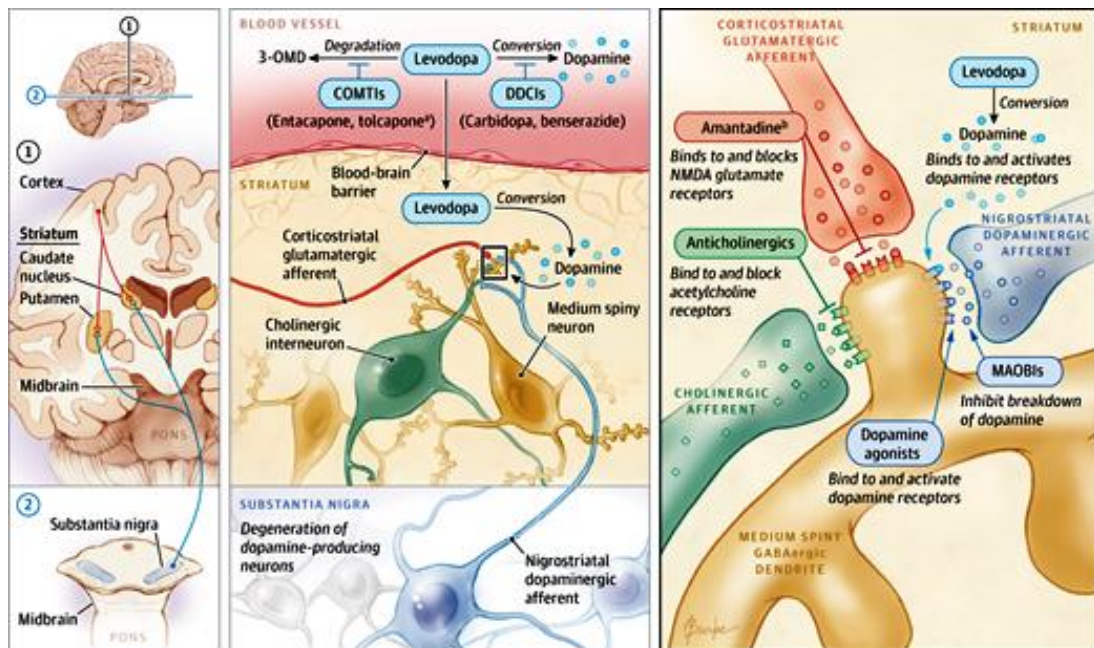


Figura 1. Illustrazione schematica delle vie neurologiche implicate nella malattia di Parkinson e siti d'azione dei farmaci utilizzati nel trattamento dei sintomi motori della patologia. I farmaci utilizzati nella farmacoterapia del Parkinson agiscono a livello di complesse vie neuronali dello striato, la cui integrazione è alla base della regolazione del movimento. Queste sono rappresentate dalle afferenze dopaminergiche che originano dalla sostanza nera, da quelle glutammatergiche che originano dalla corteccia e dal talamo e dagli interneuroni colinergici. L'insieme di queste regola l'attività dei neuroni spinosi medi GABAergici. La levodopa, attraversata la barriera ematoencefalica, è convertita in DA. Al di fuori della barriera, gli inibitori delle decarbossilasi periferiche (DDCI) bloccano la conversione periferica di levodopa in DA, mentre gli inibitori delle catecol-O-metiltransferasi (COMTIs), bloccano la degradazione della DA in 3-O-metildopa (3-OMD). Nello striato, la levodopa, gli agonisti dopaminergici e gli inibitori delle monoamminossidasi B (MAOBI) esercitano i loro effetti terapeutici mediante meccanismi diversi a seconda della classe di appartenenza. I farmaci anticolinergici e l'amantadina, agiscono sui recettori post-sinaptici di altri neurotrasmettitori, i quali attivano a loro volta altri sistemi recettoriali sia livello presinaptico, che a livello post-sinaptico (Connolly e Lang, 2014).

E' importante sottolineare che, allo stato attuale, non esistono terapie in grado di curare la malattia di Parkinson, così come non esistono agenti neuroprotettivi preventivi. L'inizio della terapia avviene solitamente al momento della diagnosi e quando lo stato del paziente necessita l'intervento farmacologico. Le caratteristiche del farmaco da somministrare sono in dipendenza dal tipo di sintomi, dalla loro gravità e dall'età del paziente; se i sintomi sono di lieve intensità, la somministrazione di levodopa e/o agonisti dopaminergici, non è indicata, è preferibile infatti optare per la somministrazione di inibitori delle monoamminossidasi B (selegilina e/o rasagilina), o farmaci anticolinergici, i

quali nelle prime fasi della patologia, si sono dimostrati significativamente più efficaci del placebo (Connolly e Lang, 2014). Nella pratica clinica, è suggerito l'inizio del trattamento del paziente parkinsoniano con levodopa e/o agonisti dopaminergici, nel momento in cui presenta una sintomatologia non gestibile con farmaci alternativi.

Pramipexolo: aspetti chimici, farmaceutici e biologici

Il pramipexolo dicloridrato monoidrato [(S)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propylamine-benzothiazole-dihydro-chloride] (PPX) (Figura 2), è un agonista non-ergot dei recettori dopaminergici, sintetizzato allo scopo di essere utilizzato, nella terapia della malattia di Parkinson, come farmaco coadiuvante la levodopa (Silindir e Ozer, 2014). I primi studi clinici sono stati effettuati nei primi anni '90, in pazienti sia in stadio primario che avanzato. Nel 1997 il farmaco ottenne l'approvazione della Food and Drug Administration (Hubble *et al.*, 1995; Kieburtz *et al.*, 1997; Shannon *et al.*, 1998).

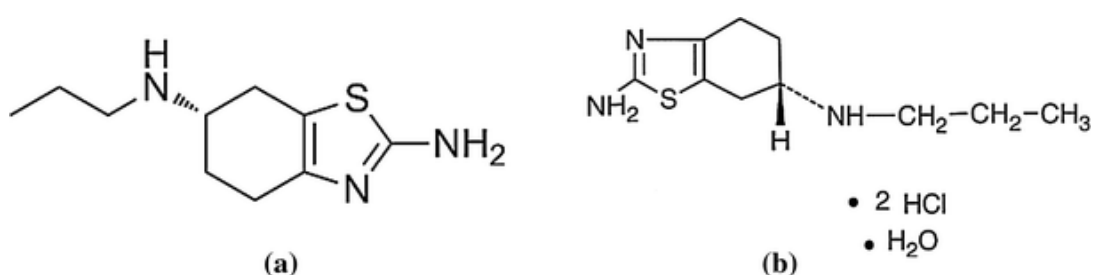


Figura 2. Pramipexolo (a) e Pramipexolo dicloridrato monoidrato (b) (Silindir e Ozer, 2014)

Il profilo farmacocinetico del PPX è stato studiato nel topo, ratto, coniglio, maiale nano e primati non umani, le principali specie animali utilizzate nella sperimentazione pre-clinica (EMA, 2005). E' un composto stabile, solubile in acqua (20%), metanolo (8%), etanolo (0,5%) e insolubile in diclorometano. L'analisi delle sue proprietà farmacocinetiche, rivela che è facilmente assorbito nel tratto gastrointestinale, con picco plasmatico a 2-3 ore. Dopo somministrazione orale la sua biodisponibilità è oltre il 90%, e le interazioni con la presenza di cibo a livello gastro-enterico, sono trascurabili (Hubble, 2000). La sua emivita è di circa 8-12.9 ore (Wright *et al.*, 1997). Dopo somministrazione orale di ¹⁴[C]-PPX il destino metabolico è simile nel ratto, topo, cane, primati non umani e uomo. Subisce principalmente dealchilazione, idrossilazione e glucuronazione, e presenta una escrezione prevalentemente renale. Circa il 90% del farmaco è eliminato con le urine immodificato, insieme a 5-8 metaboliti. Non ha interferenze con l'attività del citocromo P450, quindi non altera il metabolismo di altri farmaci assunti contemporaneamente (Wynalda e Wienkers, 1997), anche se potrebbe aumentare l'assorbimento della levodopa (EMA, 2005). Il legame alle proteine plasmatiche è minore del 20%, e il suo volume di distribuzione è di circa 500 litri (Sweetman, 2009). Presenta una buona distribuzione tissutale, con percentuali, fino a 9 volte superiori, nel cervello rispetto al plasma. E' stato

osservato, nel ratto, un trasferimento placentare e sono state misurate concentrazioni di PPX di 6 volte superiori nel latte materno, rispetto al plasma (EMEA, 2005).

Tra gli effetti collaterali annoveriamo nausea, vomito, capogiri e ipotensione ortostatica (Silindir e Ozer, 2014). Alcuni di questi effetti potrebbero aggravare gli stati off della patologia, le fluttuazioni tra gli stati discinetici e non, e inoltre indurre sonnolenza, allucinazioni, insonnia, confusione mentale, astenia (Holloway *et al.*, 2004). L'iperstimolazione dopaminergica, soprattutto ad inizio trattamento, può essere la causa di una serie di effetti avversi periferici, fra i quali reazioni a livello gastrointestinale (costipazione), genito-urinario (aumento frequenza minzione) e cardiovascolare (Silindir e Ozer, 2014).

Non sono presenti evidenti segni di tossicità acuta in nessuna specie animale studiata, la dose letale nel ratto è stimata in 70-105 mg/kg. Sono stati, invece, riscontrati segni di tossicità dopo somministrazioni ripetute, in elementi con risposta farmacodinamica esagerata al farmaco comprendenti iperstimolazione dopaminergica D_2 , adrenergica α_2 e istaminergica H_2 . Risposte motorie esagerate come ipermotilità sono associate ad eventi secondari come riduzione eccessiva del peso corporeo e altri sintomi stress correlati (EMEA, 2005). In studi di tossicità riproduttiva è stato dimostrato che il PPX interferisce con il ciclo ovarico e riduce la fertilità, proprietà in comune con tutti gli agonisti dopaminergici, la cui azione è legata all'inibizione della produzione di prolattina. Nessun effetto è stato invece osservato sulla riproduttività maschile. Non sono stati osservati effetti teratogeni, ma il PPX, nel ratto, se somministrato a dosi tossiche risulta essere embriotossico.

Il PPX è un agonista dei recettori dopaminergici, con selettività di legame da 5 a 7 volte maggiore per i recettori D_3 rispetto ai D_2 e D_4 (Mireau *et al.*, 1995, Hubble, 2000; Piercey *et al.*, 1996), mentre non possiede nessuna azione sui recettori D_1 (Mireau e Schingnitz, 1992). Inoltre, si lega con scarsa affinità ai recettori α_1 e α_2 adrenergici, ai recettori colinergici e serotoninergici 5HT1A e istaminergici (EMEA, 2005), e con bassa affinità ai recettori serotoninergici 5HT2A e 5HT2B (Constantinescu, 2008; Piercey *et al.*, 1996). L'alta affinità del PPX verso i recettori D_3 , superiore anche a quella del (+)-7-OH-DPAT, farmaco sino ad oggi utilizzato negli studi preclinci (Piercey *et al.*, 1996), fornisce al PPX delle caratteristiche peculiari che lo differenziano dagli altri agonisti dopaminergici utilizzati nella terapia della malattia di Parkinson (Piercey *et al.*, 1996).

Allo stato attuale il meccanismo d'azione del PPX non è stato ancora completamente chiarito. E' stato osservato che, al pari del quinpirolo (agonista D_2/D_3),

inibisce l'attività dei neuroni della sostanza nera pars compacta e dell'area ventrale del tegmento, effetto che, a causa della mancanza di agonisti e antagonisti selettivi in grado di discriminare le azioni sui differenti recettori dopaminergici, non si può stabilire se sia mediato dai recettori D_3 e/o D_2 (Piercey *et al.*, 1996). E' stato inoltre dimostrato che il PPX, stimolando i recettori dopaminergici D_3 a livello striatale, contribuisce da un lato alla sua efficacia nel trattamento della malattia di Parkinson, e dall'altro nell'impiego dello stesso nel disturbo depressivo maggiore (Hyslop *et al.*, 1993; Piercey *et al.*, 1996).

Nello striato, i recettori dopaminergici D_3 sono co-localizzati con i recettori D_1 sui neuroni GABAergici contenenti dinorfina e sostanza P, i quali costituiscono la via diretta striato-pallidale (striato-nigrale nei roditori) (Figura 3).

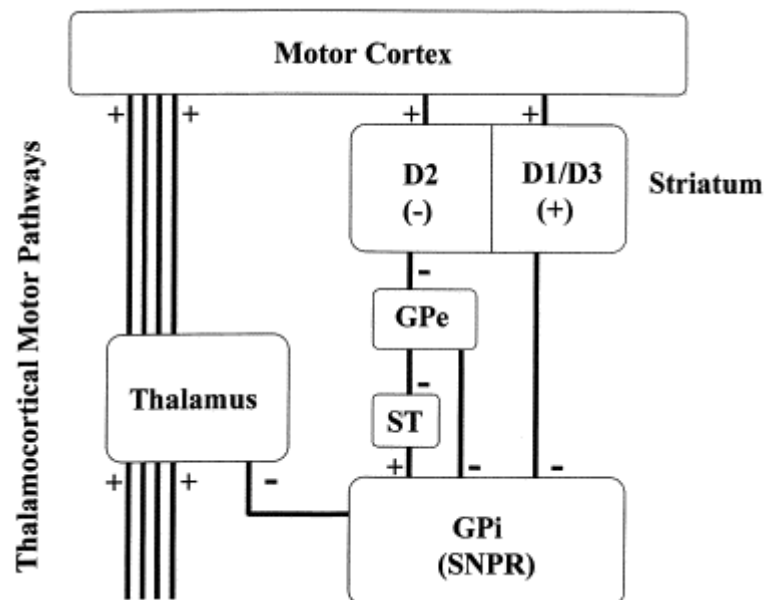


Figura 3. Rappresentazione schematica del ruolo dei recettori dopaminergici nella regolazione delle funzioni motorie a livello dei gangli della base. I segnali inibitori GABA sono indicati con il simbolo '-' e quelli eccitatori glutamatergici con il simbolo '+'. GPe = globo pallido esterno; ST = nucleo subtalamico; GPi = globo pallido interno; SNPR = sostanza nera pars reticolata (Bennett e Piercey, 1998).

I recettori dopaminergici D_2 , invece, sono localizzati sui neuroni GABAergici contenenti encefalina, i quali costituiscono la via indiretta. In condizioni fisiologiche, la DA, da un lato inibisce l'attività dei neuroni GABAergici della via indiretta mediante un meccanismo D_2 mediato, dall'altro stimola l'attività dei neuroni GABAergici della via diretta mediante un meccanismo D_1 e D_3 mediato. La risultante di questa duplice azione inibisce il globo pallido interno, dal quale originano afferenze al talamo, che a sua volta regola gli input diretti alla corteccia motoria. Nella malattia di Parkinson, la disregolazione dopaminergica a carico di entrambe le vie, provoca l'inibizione del nucleo talamico, il

quale a sua volta genera un segnale inibitorio alla corteccia, che si traduce nell'insorgenza della bradicinesia (Bennet e Piercey, 1999). E' stato ipotizzato che il PPX possieda una duplice azione: agendo sui recettori D₃, attiva la via diretta rimuovendo il tono inibitorio del globo pallido interno, e agendo sui recettori D₂ stimola quella indiretta. La sinergia di questi due effetti potrebbe essere alla base della sua efficacia terapeutica nel Parkinson (Bennet e Piercey, 1999). In altre parole, la concomitante attivazione dei neuroni striato pallidali (D₃ mediata), unita all'inibizione dei neuroni della via indiretta (D₂ mediata) è in grado di rimuovere il tono inibitorio della via talamo-corticale, ristabilendo l'equilibrio fisiologico, contrastando in questo modo i deficit motori associati alla patologia (Bennet e Piercey, 1999).

A livello preclinico, il PPX si è dimostrato efficace nei modelli animali della patologia. Infatti, nel modello animale ottenuto nel ratto con la lesione del fascio mediale del mesencefalo con la neurotossina 6-idrossidopamina (6-OHDA), la somministrazione di PPX, induce un comportamento rotatorio (turning) controlaterale alla lesione della durata di circa due ore; nel modello animale ottenuto nei primati non umani, a seguito del trattamento con MPTP, il PPX riduce significativamente i deficit motori ad essa associati (Mierau e Schingnitz, 1992). L'attivazione locomotoria indotta dalla somministrazione di PPX in modelli animali è associata soprattutto all'azione D₂ e bloccata dalla somministrazione di antagonisti di questo recettore (Maj *et al.*, 1997), mentre la somministrazione di agonisti D₁ ne aumenta l'attività (Yamada *et al.*, 1990).

Uno studio clinico condotto su 55 pazienti affetti da malattia di Parkinson in stadio iniziale-moderato, mai trattati farmacologicamente, ha messo in evidenza che, il PPX introdotto con dosaggio graduale fino ad un massimo di 1.5 mg per 3 volte al giorno, è in grado di migliorare i deficit motori rispetto al placebo, valutati secondo la "Unified Parkinson's Disease Rating scale", la scala di valutazione maggiormente utilizzata dai clinici nella valutazione della prognosi della patologia, inclusa la valutazione delle complicazioni motorie (Hubble, 2000).

In accordo con queste evidenze, Shannon *et al.* (1998), hanno dimostrato che il PPX riduce significativamente i deficit motori già a sei mesi dall'inizio del trattamento e il 73% dei pazienti partecipanti allo studio ha introdotto la levodopa solo dopo 2 anni. Il PPX si è dimostrato efficace anche in caso di Parkinson in stadio avanzato, in quanto ha alleviato i sintomi motori, portando ad una riduzione della dose giornaliera di levodopa (Lieberman *et al.*, 1997).

Allo stato attuale, l'analisi statistica dei dati ottenuti dai trial clinici, non permette di chiarire se l'introduzione in terapia del PPX, precedente alla levodopa, sia effettivamente efficace nel posticipare gli effetti collaterali di quest'ultima (Hubble, 2000), anche se esistono chiare evidenze che supportano il fatto che l'inizio del trattamento farmacologico con agonisti dopaminergici, come il PPX, può essere realmente un valido stratagemma terapeutico per ritardare l'utilizzo della levodopa, riducendo le complicazioni motorie ad essa associate. Inoltre, il trattamento iniziale con PPX da solo o in associazione con levodopa, potrebbe non solo ridurre l'incidenza di effetti avversi, ma anche il costo della terapia (Abib *et al.*, 2012).

Oltre a questi benefici, non si possono trascurare gli effetti neuroprotettivi del PPX, derivati probabilmente, da un lato dalla sua capacità di stimolare gli auto recettori D₂ riducendo la sintesi e il turnover della DA (Hall *et al.*, 1996), abbassando le concentrazioni dei suoi metaboliti potenzialmente tossici e in grado di indurre stress ossidativo, dall'altro agendo direttamente come scavenger dei radicali liberi, azione dovuta al suo basso potenziale di ossidazione (Hubble, 2000). E' stato dimostrato che in topi trattati con anfetamina o soggetti ad insulti ischemici, il PPX contrasta la degenerazione a carico dei neuroni dopaminergici, così come la morte neuronale (Hall *et al.*, 1996). Inoltre, il PPX promuove la produzione dei fattori di crescita che migliorano la risposta ad insulti tossici (Carvey *et al.*, 1997). Infine, la stimolazione dei recettori D₃ è stata associata, in vitro, ad un aumento dei fattori di crescita nelle cellule esprimenti tale sottotipo recettoriale (Swarzenski *et al.*, 1996).

Il PPX, oltre ad essere un farmaco con comprovata efficacia terapeutica nella malattia di Parkinson, è utile anche nella terapia del disturbo depressivo maggiore, sia come monoterapia, sia nella terapia di pazienti resistenti all'azione di altri farmaci antidepressivi (Sporn *et al.*, 2000; Cassano *et al.*, 2004; Golberg *et al.*, 2004). Diversi studi hanno messo in evidenza che il trattamento prolungato con PPX induce desensibilizzazione dei recettori D₂ nell'area ventrale del tegmento, normalizzando l'attività dei neuroni dopaminergici e dei recettori serotoninergici 5-HT_{1A} nel nucleo dorsale del raphe (Chernoloz *et al.*, 2009). E' stato dimostrato mediante uno studio preclinico condotto da Chernoloz *et al.* (2012), che dopo un trattamento prolungato con il PPX (2 settimane), si assiste ad un aumento della trasmissione dopaminergica che deriva probabilmente dalla normalizzazione dell'attività neuronale e dal bilanciamento tra rilascio e sintesi, unito alla presenza del PPX a livello dei terminali (Chernoloz *et al.*, 2012). Il PPX, infatti, stimolando gli autorecettori D₂ nell'area ventrale del tegmento, diminuisce il tasso di

eccitazione dopaminergico mediante un meccanismo a feedback esercitato dagli stessi recettori D₂ in seguito ad esposizione acuta (Chernoloz *et al.*, 2009), tuttavia, il trattamento cronico è in grado di stabilizzare il tasso di eccitazione neuronale e di aumentare il tono serotoninergico (Chernoloz *et al.*, 2012), il cui effetto contrasta la sintomatologia depressiva.

Berghauzen-Maciejewska *et al.*, (2014) hanno valutato in ratti con lesione dello striato ventro-laterale, l'effetto del PPX nel test del nuoto forzato, comparandolo a quello di imipramina e fluoxetina. Gli autori hanno osservato un aumento del tempo di immobilità, un effetto che non sembra correlato ad una condizione generale di disabilità, dato che l'attività locomotoria (misurata come distanza percorsa) non è ridotta dopo la lesione. Partendo dalla considerazione che il test del nuoto forzato è utilizzato allo scopo di valutare l'espressione comportamentale di uno stato depressivo (Porsolt *et al.*, 1978; Dekte *et al.*, 1995), la somministrazione cronica (13 gg) di PPX, ma non di fluoxetina o imipramina, riduce il tempo di immobilità degli animali lesionati rispetto ai controlli (Berghauzen-Maciejewska *et al.*, 2014). Tale effetto sembra correlato all'attivazione dei recettori D₃ piuttosto che a quelli D₂, dato che è bloccato da antagonisti non selettivi dei recettori D₂ e D₃ ma non in topi knockout per il recettori D₃ (Siuciak e Fujiwara, 2004).

Il PPX, possiede una serie di effetti collaterali, come la capacità di indurre disturbi del controllo degli impulsi. Nel foglio illustrativo della specialità medicinale *Mirapexin* 0,18 mg cpr (Boheringer Ingelheim IT Spa), alla voce "effetti indesiderati" sono elencate le seguenti controindicazioni: comportamento alterato, stato confusionale, delirio, senso di affaticamento, allucinazioni, ipercinesia, aumento dell'appetito (impulso incontrollato ad alimentarsi, iperfagia), insonnia, alterazioni della libido, nausea, paranoia, gioco d'azzardo patologico, sonnolenza.

Di seguito è riportata un'analisi dettagliata dei dati epidemiologici e sperimentali di questo aspetto del PPX, il quale sarà parte di questo lavoro di tesi.

Disturbi del comportamento associati alla terapia dopaminergica sostitutiva

Generalità

Recentemente, è stata messa in evidenza l'esistenza di una possibile correlazione tra la terapia con agonisti dopaminergici D₂/D₃ e l'incidenza di comportamenti assimilabili a delle vere e proprie dipendenze comportamentali, come il gioco d'azzardo patologico, lo shopping compulsivo e la sindrome da disregolazione dopaminergica (Evans *et al.*, 2009; Voon *et al.*, 2009; Weintraub *et al.*, 2010). Inoltre, sono state osservate delle vere e proprie crisi di astinenza in seguito all'interruzione della terapia dopaminergica sostitutiva (Rabinark e Nerimberg, 2010; Thobois *et al.*, 2010).

Queste evidenze hanno portato ad ipotizzare che la stimolazione continua dei sistemi dopaminergici da parte dei farmaci, vada oltre il puro beneficio terapeutico. Essi vanno a stimolare indiscriminatamente tutte le componenti dopaminergiche, anche quelle meno coinvolte nella patologia, ad esempio il sistema mesolimbico, con il risultato della comparsa di alterazioni dei processi alla base della ricompensa (Frank *et al.*, 2004; Lawrence *et al.*, 2003; Schott *et al.*, 2007).

Il gruppo di Wolters (Wolters *et al.*, 2008) ha proposto una classificazione dei disturbi comportamentali associati al Parkinson, basata sul fatto che, i sintomi motori e non motori possono essere la manifestazione di fattori intrinseci (condizione puramente collegata allo stato patologico), o estrinseci (correlati alla terapia), oppure di entrambi. Su queste basi gli autori hanno classificato tali disturbi come (i) sindromi indotte da deficit di DA; (ii) sindromi indotte da dipendenza da farmaci in grado di aumentare i livelli di DA, (iii) sindrome da disregolazione dopaminergica e (iv) disturbi del controllo degli impulsi (Wolters *et al.*, 2008).

Un aspetto fondamentale che potrebbe essere alla base della loro manifestazione, è rappresentato dall'ipotesi dell'esistenza di una possibile correlazione tra la loro incidenza e il tipo di personalità.

E' stato evidenziato che gli individui denominati "*sensation-seeking*", ovvero coloro che ricercano sensazioni nuove e stimolanti e che sono inclini alle dipendenze, manifestano maggiormente i disturbi della personalità associati alla terapia dopaminergica sostitutiva (Evans *et al.*, 2005). Inoltre, i pazienti parkinsoniani che sviluppano la sindrome da disregolazione dopaminergica possiedono caratteristiche intrinseche peculiari, che vanno da storie pregresse di abuso, comportamenti impulsivi/compulsivi preesistenti alla patologia, alcolismo, e condizioni di vita particolarmente disagiate (Evans *et al.*, 2005).

La sindrome da disregolazione dopaminergica e il gioco d'azzardo

Descritta originariamente da Giovannoni *et al.* (2000), come una disregolazione dei processi omeostatici alla base dell'edonia, la sindrome da disregolazione dopaminergica è oggi ampiamente riconosciuta come una conseguenza del trattamento cronico con la terapia dopaminergica sostitutiva per la quale i pazienti sviluppano un pattern di dipendenza, e in cui si possono manifestare stati di astinenza (Fenu *et al.*, 2009).

Lo sviluppo di tale sindrome, spesso associata al punding (comportamento compulsivo caratterizzato da una forte attrazione per i compiti ripetitivi, meccanici, come ad es. montare e smontare elettrodomestici o altri apparecchi, la tendenza a collezionare meticolosamente svariati oggetti), sembrerebbe una peculiarità dei soggetti in terapia con levodopa, piuttosto che con gli agonisti dopaminergici. E' stata evidenziata inoltre, la sua associazione con Parkinson giovanile, stadi depressivi preesistenti alla patologia, uso di alcool e/o sostanze illecite e, come precedentemente affermato, una personalità volta alla ricerca del nuovo (Evans e Lees, 2004; Evans *et al.*, 2005). Una classificazione più recente associa, oltre al punding, anche l'ipersessualità, lo shopping e l'alimentazione compulsivi e la dipendenza da terapia dopaminergica sostitutiva (O'Sullivan *et al.*, 2009).

Il gioco d'azzardo, classificato come "disturbo del controllo degli impulsi non altrimenti classificato", nella IV edizione del Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali, è stato recentemente ridefinito nella V edizione e inserito nella categoria dei disturbi associati alla dipendenza e all'abuso di sostanze (American Psychiatry Association, 2013). La ragione che ha indotto la Società Americana di Psichiatria, ad apportare tale cambiamento è dovuta in gran parte alla crescente diffusione del problema e all'aumento delle conoscenze scientifiche che dimostrano, mediante studi di neuroimmagine, che il gioco d'azzardo possiede le stesse caratteristiche di una dipendenza, a parità di sintomi e segni e di aree cerebrali coinvolte (Holden, 2010).

La prevalenza del gioco d'azzardo patologico varia tra lo 0.4% e il 3.4% della popolazione adulta (Shaffer *et al.*, 1999; Topf *et al.*, 2009; Desai *et al.*, 2007), ma è sorprendentemente più alta se si analizzano coorti di pazienti parkinsoniani e sotto trattamento farmacologico, con punte che arrivano al 17% (Djamshidian *et al.*, 2011, Voon *et al.*, 2006; Seedat *et al.*, 2000). Infatti, la prevalenza del fenomeno va dal 6% osservato in pazienti non trattati con levodopa, fino al 17% in quelli trattati con tale farmaco o con agonisti dopaminergici (Voon *et al.*, 2006). E' stato dimostrato che nei pazienti in trattamento con la terapia dopaminergica sostitutiva, la somministrazione di levodopa potrebbe aumentare il rischio di incidenza del gioco d'azzardo patologico del 50%

(Imamura *et al.*, 2006; Weintraub *et al.*, 2010). Come per la sindrome da disregolazione dopaminergica precedentemente descritta, il gioco d'azzardo patologico nel paziente parkinsoniano è spesso associato a stadi precoci della patologia, a lunghi trattamenti farmacologici e a personalità volte alla ricerca della novità e delle sensazioni forti (Voon *et al.*, 2006a,b, Pontone *et al.*, 2006; Weintraub *et al.*, 2006). Altri fattori di rischio includono la giovane età, sesso maschile, dipendenza da tabacco, storie pregresse personali o familiari di abuso di etanolo e tratti impulsivi (Weintraub *et al.*, 2010; Voon e Fox, 2007; Gallagher *et al.*, 2007, Voon *et al.*, 2007). Un' interessante studio di Petry *et al.* (2005), ha messo in evidenza un elevato tasso di comorbidità tra gioco d'azzardo patologico e uso/abuso di sostanze illecite. Gli autori hanno determinato che il 73.2% dei giocatori patologici faceva uso cronico di alcool, il 38.1% abusava di sostanze illecite, il 60.4% era dipendente dalla nicotina, inoltre il 49.6% soffriva di disturbi del tono dell'umore, il 41.3% di disturbi d'ansia e il 60.8% di disturbi della personalità.

L'analisi del fenomeno e le conoscenze ad oggi disponibili, basate soprattutto su studi clinici, mettono in evidenza che il PPX potrebbe giocare un ruolo in primo piano nell'insorgenza sia del gioco d'azzardo patologico, sia della sindrome da disregolazione dopaminergica. Alcuni autori sono concordi nell'affermare che le concentrazioni di DA, ma non la levodopa, potrebbero essere responsabili del peggioramento delle funzioni esecutive nei pazienti in fase iniziale/moderata della patologia (Brusa *et al.*, 2003), in quanto la DA possiede un'affinità superiore per i recettori D₃ (da 20 a 100 volte più affine per i recettori D₃ rispetto ai recettori D₂) e poca affinità per i recettori D₁ (Weiss e Marsh, 2012).

Allo stato attuale, il ruolo e il coinvolgimento degli agonisti dopaminergici nel gioco d'azzardo non è stato ancora del tutto chiarito. Voon *et al.* (2006 a,b), sono concordi nell'affermare che la manifestazione di tale sindrome è associata alle concentrazioni di DA e non al tipo di agonista somministrato o alla dose utilizzata, in quanto sia il pergolide (agonista D₁/D₂), che il PPX (agonista D₂/D₃) o il ropinirolo (agonista D₂/D₃), sono implicati nell'esacerbazione del fenomeno nella stessa misura (Voon *et al.*, 2006 a,b). Altri autori, invece, suggeriscono una differenziazione del ruolo degli agonisti dopaminergici, basata essenzialmente sulla loro affinità recettoriale (Driver-Dunckley *et al.*, 2003, Dodd *et al.*, 2005). Questa ipotesi è suffragata dall'evidenza che il PPX è il farmaco associato con maggior prevalenza all'insorgenza di gioco d'azzardo patologico. Queste alterazioni potrebbero essere correlate all'eccessiva stimolazione dei recettori D₃ nelle aree limbiche, le quali, è ben noto, oltre ad essere aree ricche di tali recettori, rivestono un'importanza

fondamentale nel processo dei meccanismi coinvolti nelle dipendenze e nei comportamenti impulsivo/compulsivi (Caine e Koob, 1993; Dodd *et al.*, 2005; Retz *et al.*, 2003; Heidbreder *et al.*, 2005).

Dall'analisi della letteratura si evince che il PPX è stato la causa del 58% (39 su 67) dei casi di gioco d'azzardo patologico riportati sino al marzo del 2005 (Fenu *et al.*, 2009), mentre nel 2007, dei 177 casi di pazienti parkinsoniani con gioco d'azzardo patologico conclamato riportati in letteratura, il 98% stava assumendo un agonista dopaminergico e il 74% non aveva mai avuto esperienze precedenti di gioco d'azzardo (Gallagher *et al.*, 2007). E' stato documentato inoltre, che dosi elevate di levodopa possono indurre comportamenti patologici su un'alta percentuale di pazienti (8 su 20), i quali tendono a diminuire in 7 su 8 quando le dosi vengono ridotte (Castrioto *et al.*, 2015). In questo complicato quadro, anche i disturbi associati al tono dell'umore posso rappresentare un fattore di rischio, in quanto relazionati alle scarse performance ottenute nei test cognitivi da parte di pazienti affetti da gioco d'azzardo patologico (Pontone *et al.*, 2006; Santangelo *et al.*, 2009).

Basi neurali

Sulla base delle evidenze scientifiche si può ipotizzare che i circuiti neuronali coinvolti siano sia quello striato-talamo-corticale che quello mesolimbico (vedere Figura 4 per dettagli, Fenu *et al.*, 2009), i quali sono implicati nei processi alla base della dipendenza. Pirritano *et al.* (2014), hanno messo in evidenza che, a differenza dalle dipendenze, non esistono differenze significative dell'espressione dei recettori D₂ e D₃ in soggetti con o senza disturbo da gioco d'azzardo suggerendo che una modifica nell'espressione di tali recettori, possa non essere un fattore chiave nello sviluppo di tale sindrome. Tuttavia, secondo altri studi, è stato dimostrato un aumento dell'attività dei recettori D₃, e questo è stato correlato alla severità del gioco d'azzardo e all'impulsività dei giocatori (Boileu *et al.*, 2013a,b). Inoltre, mediante la tomografia ad emissione di positroni, è stata recentemente studiata la distribuzione dei recettori D₂ e D₃ in pazienti che fanno uso di cocaina, metanfetamina e in pazienti con gioco d'azzardo patologico. I risultati ottenuti suffragano quelli di studi precedenti, infatti, in tali soggetti, è stata messa in evidenza una sovra espressione dei recettori D₃, ma non dei recettori D₂ (Le Foll *et al.*, 2014). In uno studio condotto su pazienti dipendenti da cocaina, è stato evidenziato un aumento dei recettori D₃ nella sostanza nera superiore rispetto alla popolazione di controllo, mentre è stata riscontrata una riduzione dell'espressione dei recettori D₂ nello striato (Payer *et al.*, 2014).

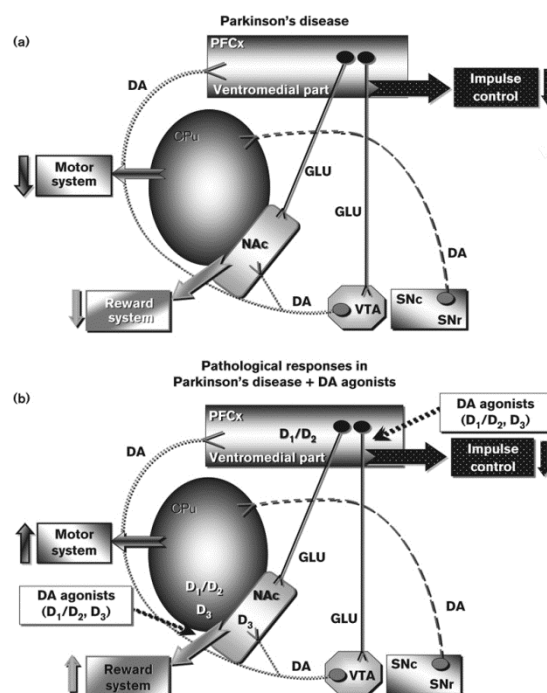


Figura 4. Rappresentazione schematica delle principali strutture (proiezioni, circuiti, recettori) coinvolte nella carenza dopaminergica tipica della malattia di Parkinson (a) e dopo un trattamento cronico con agonisti dopaminergici (b). I neuroni dopaminergici sono localizzati principalmente nella sostanza nera compacta (SNpc) e nell'area ventrale del tegmento (VTA). I loro assoni proiettano allo striato dorsale (corteccia prefrontale, caudato-putamen), allo striato ventrale, al nucleus accumbens (NAc) e alla corteccia cerebrale. Sia il NAc che la VTA ricevono numerose afferenze glutammatergiche dalle aree corticali prefrontali. La perdita di neuroni dopaminergici nel Parkinson interessa le proiezioni nigrostriatali ed è responsabile dei deficit motori che caratterizzano la malattia. Tuttavia la perdita di neuroni interessa in misura minore anche le proiezioni mesolimbiche e mesocorticali, comprendendo i neuroni dopaminergici che dalla VTA proiettano al NAc, alla corteccia prefrontale ventrale e alla corteccia frontale. I recettori dopaminergici svolgono un ruolo fondamentale nelle aree limbiche e corticali, le quali sono coinvolte nei processi alla base della gratificazione, nella dipendenza e nel controllo degli impulsi. Pertanto si ritiene che la degenerazione delle proiezioni dopaminergiche (nigrostriatali, mesolimbiche e mesocorticali) in aggiunta alla stimolazione cronica dei recettori dopaminergici possa essere responsabile non solo dei sintomi motori (discinesie), ma anche dei comportamenti che riguardano la sfera affettiva e impulsiva (sindrome da disregolazione dopaminergica, disturbo da gioco d'azzardo, ipersessualità, ecc.) (Fenu *et al.*, 2009).

Inoltre, l'attivazione dei recettori D_3 è fortemente correlata, in pazienti cocainomani, alle scelte effettuate in condizioni di rischio e valutate in un task decisionale, o agli errori commessi in un task che misura il grado di auto controllo (Payer *et al.*, 2014). Nell'insieme, questi risultati possono essere interpretati sulla base della possibile correlazione tra il genotipo e grado di espressione dei recettori D_3 , con la comparsa di condizioni quali impulsività e incapacità nelle scelte decisionali (Le Foll *et al.*, 2014). Si pensa che la stimolazione dei recettori dopaminergici D_1 e D_2 , localizzati nello striato

dorso laterale, sia responsabile degli effetti farmacologici che interessano la sfera motoria, mentre l'eccessiva stimolazione dei recettori D₃ nelle aree mesolimbiche, potrebbe essere uno dei fattori responsabili dell'insorgenza del gioco d'azzardo patologico (Driver-Dunckley *et al.*, 2003, Sokoloff *et al.*, 1990; Perachon *et al.*, 1999; Gschwandtner *et al.*, 2001; Ferrara e Stacy, 2008). La deplezione dopaminergica caratteristica della malattia di Parkinson, può indurre anomalie funzionali nei circuiti cognitivi, nel circuito limbico, e in quelli associativi talamo-corticali, le quali potrebbero predisporre l'insorgenza del gioco d'azzardo nei pazienti affetti da tale patologia (Pirritano *et al.*, 2014). L'eccessiva stimolazione dopaminergica nello striato ventrale, nelle prime fasi della patologia, potrebbe produrre una "overdose" che si riflette nella comparsa di comportamenti impulsivo-compulsivi, nei quali la prolungata sensibilizzazione dello striato ventrale, è in grado di mantenere comportamenti guidati dall'inabilità nelle scelte decisionali e nell'apprendimento dei risvolti negativi (Evans *et al.*, 2006).

Oltre al ruolo cruciale della DA, evidenze scientifiche confermano che anche la serotonina potrebbe essere coinvolta in tale fenomeno (Decaria *et al.*, 1998), mentre elevati livelli di noradrenalina sono stati ritrovati nelle urine di pazienti affetti da gioco d'azzardo (Weinshenker e Schroeder, 2007, Roy *et al.*, 1988) e il diminuito tono GABAergico sembra essere coinvolto nell'espressione dei comportamenti impulsivi (Kapogiannis *et al.*, 2001; Jupp *et al.*, 2013, Hayes *et al.*, 2014).

I ratti inbred Lewis e Fischer 344 come modello per lo studio delle dipendenze

Le differenze nella distribuzione delle popolazioni recettoriali, nella responsività del sistema dopaminergico mesolimbico e nel tipo di personalità, richiedono una particolare attenzione anche a livello preclinico, nel quale l'utilizzo di differenti ceppi di animali è di particolare importanza, in quanto essi possono rappresentare una base genetica per indagare sui processi e sulle alterazioni responsabili delle patologie. In campo preclinico sono ampiamente utilizzati due ceppi di ratti inbred Lewis e Fischer 344, poiché essi differiscono a livello comportamentale, farmacologico e biochimico, nelle risposte che coinvolgono il sistema mesolimbico e la trasmissione dopaminergica (Flores *et al.*, 1998). Su queste basi, tali ceppi di ratti, in particolare quello Lewis, potrebbero rappresentare un valido aiuto per la realizzazione di modelli animali di Parkinson in cui studiare le alterazioni comportamentali, conseguenti il trattamento con la terapia dopaminergica sostitutiva, e che sono parte dell'oggetto di questo lavoro.

Rispetto ai ratti Fischer 344, i Lewis esprimono una maggiore attività locomotoria se posti in ambienti non precedentemente esplorati, e una maggiore attivazione

comportamentale che si traduce in un maggior numero di comportamenti stereotipati in risposta alla somministrazione di cocaina e anfetamina (Camp *et al.*, 1994; George e Golberg, 1989), che derivano dalla concentrazione maggiore di tirosina idrossilasi nell'area ventrale del tegmento, le cui fibre ascendenti proiettano al nucleus accumbens (Beitner-Johnson *et al.*, 1991). In generale, farmaci come morfina, cocaina ed anfetamina, in dipendenza dalla dose utilizzata, sono in grado di indurre un pattern di risposta differente nei due ceppi, che si traduce in un maggiore rilascio di DA nella shell e nel core del nucleus accumbens nel ceppo di ratti Lewis (Cadoni e Di Chiara, 2007). Inoltre, la pre-esposizione in adolescenza al THC è in grado di aumentare la responsività della shell del nucleus accumbens nei ratti Lewis, e di potenziare gli effetti indotti dall'esposizione, in età adulta, all'eroina, aumentando il rilascio di DA nella shell e nel core del nucleus accumbens nei ratti Lewis, e nel core dei ratti Fischer 344 (Cadoni *et al.*, 2015).

Nei differenti paradigmi sperimentali necessari allo studio dei farmaci d'abuso, i Lewis hanno dimostrato maggiore propensione all'auto-somministrazione di cocaina, oppioidi e alcol (George e Golberg, 1989; Suzuki *et al.*, 1988a; 1988b), nonché un aumento del tempo speso nel compartimento associato a cocaina, morfina ed eroina nel paradigma della preferenza spaziale condizionata (Kosten *et al.*, 1994, Cadoni *et al.*, 2015).

Dal punto di vista biochimico, il ceppo Lewis, rispetto a quello Fischer 344, è caratterizzato da una ridotta concentrazione del trasportatore della DA nello striato e nell'accumbens, e da una ridotta espressione dei recettori dopaminergici D₃ nelle aree limbiche, ma anche da una ridotta concentrazione di recettori D₂ nello striato e nel core (Flores *et al.*, 1998). A livello comportamentale, tali differenze potrebbero essere responsabili dell'attivazione locomotoria indotta dallo stress in seguito all'esposizione ad un nuovo ambiente, in quanto sia il ridotto livello del trasportatore della DA che l'alterazione dei recettori D₃, potrebbero infatti attenuare l'inibizione locomotoria, con la conseguente disinibizione degli effetti relazionati all'azione sul sistema dopaminergico (Flores *et al.*, 1998).

Inoltre, poiché la trasmissione dopaminergica è implicata nei fenomeni alla base dell'impulsività e delle risposte impulsive (van Gaalen, *et al.*, 2006a,b), tali differenze potrebbero predisporre i ratti del ceppo Lewis ad una maggiore incidenza di comportamenti impulsivi (Hamilton *et al.*, 2014). In studi precedenti è stato infatti dimostrato che i ratti Lewis compiono maggiormente scelte impulsive rispetto ai ratti Fischer 344 (Anderson e Woolverton, 2005; Madden *et al.*, 2008) e recentemente tali risultati sono stati confermati dallo studio di Hamilton *et al.* (2014), nel quale i ratti del

ceppo Lewis sono in grado di mantenere alti livelli di risposte impulsive rispetto ai ratti Fischer 344 nel test con 5 possibilità di scelta (Five Choice Serial Reaction Time Task) (Hamilton *et al.*, 2014).

Dai dati sopra elencati, si può evincere che tali modelli animali possano rappresentare un approccio sperimentale adatto allo studio non solo delle proprietà gratificanti del PPX, ma anche dei fenomeni alla base delle scelte e dei comportamenti impulsivi.

Pramipexolo: aspetti motivazionali, dipendenza ed impulsività

Il PPX è un ottimo farmaco in grado di contrastare i deficit motori associati al Parkinson, e potrebbe trovare applicazione anche nel trattamento degli stati anedonici ad esso correlati, anche se può essere causa di dipendenza e di comportamenti impulsivi.

Accanto ai sintomi motori, l'apatia rappresenta uno dei sintomi non motori più frequenti nelle fasi iniziali del Parkinson, interessando una percentuale di soggetti che oscilla tra il 17% e il 70% (Aarsland *et al.*, 2009). Essa è definita come perdita della motivazione, ed è caratterizzata dalla perdita di volontà del soggetto verso i comportamenti finalizzati (Marin, 1990; Czernecki *et al.*, 2008); inoltre, può indurre uno stato di assenza o di minore interesse verso ricompense o comportamenti finalizzati ad esse (Levy *et al.*, 2006; Starkstein e Leentjens, 2008; Schmidt *et al.*, 2008).

A livello preclinico è stato dimostrato che il PPX è in grado di contrastare lo stato amotivazionale. Drui *et al.* (2014), hanno messo in evidenza che ratti con lesioni selettive del sistema mesolimbico e mesostriatale, mostrano una significativa mancanza di motivazione, la quale può essere contrastata da agonisti dopaminergici D₂/D₃. Favier *et al.* (2014), hanno dimostrato che il PPX contrasta significativamente la riduzione delle risposte operanti nell'auto-somministrazione di sucrosio indotte dalla lesione parziale della sostanza nera pars compacta nel ratto, e che queste si riacutizzano durante astinenza dallo stesso (Favier *et al.*, 2014). Gli autori hanno concluso che il PPX, contrasta la perdita di motivazione, attribuendo valore incentivo alle ricompense naturali (Favier *et al.*, 2014).

Prove atte a chiarire se il PPX possa agire come stimolo di rinforzo incondizionato sono state ottenute da studi di auto-somministrazione e di preferenza spaziale condizionata.

Engeln *et al.* (2013), in un modello bilaterale di lesione parziale progressiva, ottenuta dalla somministrazione intracerebroventricolare di 6-OHDA, hanno messo in evidenza, per la prima volta, che sia i ratti lesi che quelli di controllo, si auto-somministrano il PPX, sebbene con frequenza di risposta inferiore rispetto a cocaina o anfetamina. La lesione parziale della sostanza nera (51%) e dell'area ventrale del tegmento (31%), non influenzano le capacità di auto-somministrazione del PPX. Lo studio di Engeln è il primo che ha dimostrato che il ratto è in grado di sviluppare un pattern di auto-somministrazione di agonisti D₂/D₃ in una condizione di schedula a rapporto fisso. I risultati di Engeln suffragano quelli di studi precedenti, i quali hanno messo in evidenza che il PPX è in grado sia di amplificare gli effetti indotti dall'auto-somministrazione di

cocaina, (Caine *et al.*, 1997, Le Foll *et al.*, 2000) sia di mantenere le risposte precedentemente associate all'auto-somministrazione della stessa (Collins *et al.*, 2011).

E' importante sottolineare che un modello animale, per fornire dei dati attendibili, deve riprodurre il più fedelmente possibile le principali caratteristiche della patologia umana (Deumens *et al.*, 2002; Przedborski *et al.*, 1995). Quindi, partendo dall'evidenza clinica secondo la quale il PPX è somministrato negli stadi iniziali della malattia (Horstnik *et al.*, 2006, Miyasaki *et al.*, 2002), Riddle *et al.* (2012) hanno effettuato una serie di esperimenti utilizzando ratti con lesione parziale bilaterale dello striato dorso laterale, l'omologo del putamen nell'uomo. Sotto tali condizioni sperimentali, gli autori hanno dimostrato che il PPX possiede sufficienti proprietà di rinforzo tali da supportare l'acquisizione della preferenza spaziale condizionata, sia nei ratti lesionati che in quelli di controllo, anche se in questi ultimi, la dose necessaria per ottenere una significativa preferenza spaziale condizionata è doppia rispetto a quella dei lesionati. Inoltre, la lesione dei terminali dorso-striatali non interferisce con l'apprendimento associativo (Riddle *et al.*, 2012). Oltre al PPX, è stato dimostrato che anche altri agonisti D₂/D₃, come 7-OH-DPAT, PD-128907 e quinolorano, sono in grado di indurre preferenza spaziale condizionata (Chaperon e Thiébot, 1996; Hoffman *et al.*, 1988; Khroyan *et al.*, 1997; Mallet e Beninger, 1994). Zengin-Toktas *et al.* (2013) in ratti con lesione bilaterale del fascio mediale del mesencefalo, hanno studiato le proprietà gratificanti di differenti agonisti selettivi dei recettori dopaminergici D₁, D₂ e D₃ comparandole a quelle indotte dalla levodopa, concludendo che la preferenza è una prerogativa degli agonisti della classe D₂, con particolare riguardo per quelli del sottotipo D₃, i quali inducono, diversamente dalla levodopa, preferenza spaziale condizionata paragonabile a quella indotta dalla cocaina.

In contrasto, esistono studi in cui è dimostrato che gli agonisti D₃ possono essere in grado di indurre avversione spaziale condizionata, ma questo potrebbe essere un effetto dose-dipendente, causato da un'azione sui recettori D₂, la cui stimolazione potrebbe controbilanciare quella sui D₃ (Gyertyan e Gal, 2003, Khroyan *et al.*, 1995).

L'area ventrale del tegmento e il nucleus accumbens sembrano svolgere un ruolo di primaria importanza nell'acquisizione della preferenza spaziale condizionata indotta dal PPX. Infatti, Ouachikh *et al.* (2013), hanno dimostrato che la porzione anteriore dell'area ventrale del tegmento, facente parte del sistema mesocorticale, non sembra essere coinvolta negli effetti di rinforzo indotti dal PPX e dalla bromocriptina. Infatti ratti con lesione bilaterale di tale area non esprimono preferenza spaziale condizionata al PPX, contrariamente a quanto avviene per la cocaina (Ouachikh *et al.*, 2013). Tuttavia, se la

lesione interessa la porzione posteriore dell'area ventrale del tegmento, facente parte del circuito mesolimbico, il PPX induce, a differenza della cocaina, una significativa preferenza spaziale condizionata (Ouachikh *et al.*, 2014). Questo risultato può essere spiegato come conseguenza del differente coinvolgimento dei due sistemi dopaminergici nella processazione delle proprietà di rinforzo dei farmaci. Il nucleus accumbens infatti, riceve la maggior parte delle afferenze dalla porzione posteriore dell'area ventrale del tegmento (circa l'85%), e a causa della lesione, potrebbe andare incontro a sensibilizzazione, che si traduce in un aumento del numero dei recettori D₂/D₃, fattore che potrebbe essere determinante per l'acquisizione ed espressione della preferenza spaziale condizionata indotta dal PPX (Ouachikh *et al.*, 2013, 2014).

Le alterazioni dei processi alla base della gratificazione, possono essere strettamente correlate all'incapacità di compiere scelte decisionali, e possono dar luogo a comportamenti impulsivi. E' stato dimostrato che la somministrazione di PPX può incrementare, in soggetti sani, sia l'apprendimento incentivo legato alle ricompense (Pizzagalli *et al.*, 2008; Santesso *et al.*, 2009), sia l'impulsività (Riba *et al.*, 2008), oltre ad aumentare gli score necessari per definire un comportamento come impulsivo (Johnson *et al.*, 2011; Madden *et al.*, 2010). Uno studio interessante di Johnson *et al.* (2011) ha valutato, nei ratti, l'effetto del PPX, in un task che richiede la scelta tra una quantità prefissata di cibo (scheda operativa a rapporto fisso), e una variabile (scheda operativa a rapporto variabile). Sotto tali condizioni, il PPX, indipendentemente dalla dose somministrata, è stato in grado di aumentare significativamente la preferenza per le scelte compiute nella scheda a rapporto variabile, incrementando la propensione verso i comportamenti volti alle scelte impulsive (Johnson *et al.*, 2011).

I recettori D₃ nella malattia di Parkinson

Come documentato, il PPX possiede un'alta affinità per i recettori dopaminergici D₃, motivo per cui riveste particolare interesse la loro distribuzione, nonché gli effetti mediati dalla loro stimolazione/blocco, sia in acuto che in cronico.

La possibilità di mappare correttamente la distribuzione recettoriale D₃ è complicata a causa della mancanza di agonisti e/o antagonisti selettivi, in quanto i composti a disposizione hanno azioni anche sui recettori D₂. Di recente sono state studiate una serie di nuove molecole in grado di agire come antagonisti altamente selettivi dei recettori D₃, come SB-277011-A (Reavill *et al.*, 2000), YQA14 (Song *et al.*, 2012), PG-01037 (Grundt *et al.*, 2007), NGB 2904 (Yuan *et al.*, 1998; Robarge *et al.*, 2001), GSK598809 (Dodds *et al.*, 2012; Nathan *et al.*, 2012; Mugnaini *et al.*, 2013), ABT-925

(Graff-Guerrero *et al.*, 2010), ST198 (Weber *et al.*, 2001; Le Foll *et al.*, 2005d), S33084 e S33138 (Millan *et al.*, 2004; 2008).

I recettori D₂ e D₃ possiedono un alto grado di similarità strutturale oltre al simile pattern di trasduzione del segnale (Neve *et al.*, 2004). In generale, i recettori D₂, sono distribuiti maggiormente a livello del caudato-putamen, mentre i D₃ sono più abbondanti nelle regioni limbiche (Joyce e Millan, 2005), nel nucleus accumbens (dove sono localizzati sia sul corpo cellulare che sulle terminazioni), nel pallido ventrale, nella sostanza nera pars reticolata e in misura minore nel caudato-putamen (Gurevich e Joyce, 1999).

A livello presinaptico, i recettori D₃ sono co-localizzati con i recettori D₂ nell'area ventrale del tegmento e nella sostanza nera pars compacta (Sokoloff *et al.*, 2006), mentre la co-espressione D₁/D₃ e D₂/D₃ è presente nelle differenti vie di proiezione dello striato ventrale, dove, in regioni come il talamo, potrebbe riflettere differenze funzionali tra la patologia umana e modelli sperimentali di Parkinson (Joyce e Millan, 2005). Nei ratti, infatti, i recettori D₃ sono preferenzialmente localizzati a livello del nucleus accumbens e nelle vie di proiezione al pallido ventrale (Stanwood *et al.*, 2000a), aree cerebrali che esprimono anche i recettori D₁ (Curran e Watson, 1995). Tuttavia, studi contrastanti hanno messo in evidenza che, nel ratto, i recettori D₃ si trovano co-localizzati anche con i recettori D₂ in neuroni del nucleus accumbens (Le Moine e Block, 1996).

Il ruolo dei recettori D₃ è tuttora oggetto di discussione. Secondo alcuni studi agiscono come autorecettori nella regolazione dei livelli extracellulari di DA (Nissbrandt *et al.*, 1995) o interagendo con il neurotrasportatore della DA (Zapata e Shippenberg, 2002, 2005). Tuttavia, altri studi hanno postulato che, a parità di meccanismo di trasduzione del segnale, i recettori D₂, ma non i D₃, siano responsabili dall'attivazione, rilascio di DA ed attività dei neuroni dopaminergici (Joyce, 2001; Millan *et al.*, 2000b); questo è in contrasto con l'evidenza che la maggior parte dei neuroni dopaminergici, sia nella sostanza nera che nell'area ventrale del tegmento, sono popolati da recettori D₃ (Diaz *et al.*, 2000).

Da un punto di vista strettamente biochimico, la somministrazione cronica di agonisti dopaminergici D₂ e D₃ potrebbe indurre un aumento dell'adenilato ciclasi, attraverso un incremento di fenomeni compensatori che ne inducono una maggiore attività, la quale sembra particolarmente manifesta dopo astinenza da tali farmaci (Watts e Neve 2005). L'effetto di agonisti dopaminergici sull'azione dell'adenilato ciclasi, in colture cellulari esprimenti i recettori D₁, D₂ e D₃ da soli o associati in dimeri, potrebbe essere differente ed avere importanti conseguenze a livello clinico (Aloisi *et al.*, 2011). In

particolare, il PPX, a differenza di farmaci attivi sui recettori D₁ come bromocriptina, lisuride e cabergolina e la DA stessa, induce una significativa ipersensibilità dell'adenilato ciclasi in cellule esprimenti i recettori D₂ e D₃ e in seguito ad astinenza da PPX stesso (Aloisi *et al.*, 2011). Inoltre, una significativa supersensibilità dell'adenilato ciclasi è stata messa in evidenza, a livello del nucleus accumbens, in membrane di topi trattati cronicamente con PPX o quinpirolo rispetto a quella che si osserva dopo trattamento con levodopa (Aloisi *et al.*, 2011). Il substrato neurologico alla base di tali processi rimane ancora oggetto di dibattito, tuttavia è possibile speculare su due ipotesi: da un lato l'aumento del fenomeno della sequestrazione recettoriale indotto dalla co-attivazione dei recettori D₂ e D₃ (Fiorentini *et al.*, 2008), e dall'altro la desensibilizzazione dei recettori dopo stimolazione cronica (Aloisi *et al.*, 2011).

Un'altra peculiarità nel meccanismo di trasduzione è rappresentata dal fatto che i recettori dopaminergici D₂ e D₃ regolano l'attività delle protein-chinasi B, le quali sono coinvolte in numerose funzioni, tra cui la crescita e proliferazione cellulare (Manning e Cantley, 2007; Beaulieu *et al.*, 2011), anche se i meccanismi alla base di tale processo rimangono ancora poco chiari. E' stato dimostrato che la somministrazione sistemica di agonisti D₂/D₃ in ratti sani aumenta la percentuale di fosforilazione di proteine coinvolte nel metabolismo neuronale a livello del nucleus accumbens e dello striato dorsale (Salles *et al.*, 2013), azione bloccata parzialmente da antagonisti D₂/D₃ (raclopride) e totalmente da antagonisti selettivi D₃ (S33084). La stimolazione dei recettori D₃ quindi potrebbe essere primariamente coinvolta nell'aumento dei fattori di crescita e del metabolismo neuronale (Salles *et al.*, 2013).

I recettori D₃ nelle discinesie

Il coinvolgimento dei recettori D₃ nel Parkinson, è particolarmente importante nell'insorgenza dei movimenti discinetici, i quali sono spesso associati a due condizioni concomitanti: da una parte la deplezione dopaminergica, e dall'altra il trattamento prolungato con levodopa. Alcuni autori ipotizzano che tali discinesie, potrebbero essere la conseguenza comportamentale di una sovra regolazione o di un aumento della sensibilizzazione dei recettori dopaminergici D₃ e glutammatergici AMPA (Chase *et al.*, 2000; Calon *et al.*, 2003 a,b; Cenci, 2007). Solo recentemente, è stato ipotizzato che le discinesie non siano correlate alla durata del trattamento con levodopa, ma al grado di degenerazione dopaminergica, in quanto esse potrebbero insorgere già dalla prima esposizione al farmaco (Cilia *et al.*, 2014).

La stimolazione recettoriale ripetuta in seguito al trattamento cronico, che si traduce nel fenomeno della sensibilizzazione comportamentale o della tolleranza inversa, (Robinson e Becker, 1986; Kalivas e Stewart, 1991), è stata studiata nei differenti modelli animali di Parkinson, i meccanismi alla base di questo fenomeno sono oggetto di controversie; infatti, non sembrano giocare un ruolo chiave né i cambiamenti metabolici (Carey, 1991) né una sovra espressione dei recettori D₁ e D₂ (Calon *et al.*, 1995; Graham *et al.*, 1993).

E' stato dimostrato che la somministrazione ripetuta e intermittente di levodopa in ratti con lesione unilaterale del fascio mediale del mesencefalo induce, oltre a sensibilizzazione comportamentale, un aumento a lungo termine dell'espressione genica dei recettori D₃ nel lato leso (Bordet *et al.*, 1997). Infatti, è stato dimostrato un aumento dell'espressione di tali recettori nello striato dorsale e nel nucleus accumbens (dove sono già presenti in condizioni fisiologiche), aree implicate rispettivamente nel controllo extrapiramidale dei movimenti e nella gratificazione (Bordet *et al.*, 1997). Inoltre, l'induzione dell'espressione dei recettori D₃ sembra essere correlata alla sensibilizzazione comportamentale, in quanto entrambi i processi avvengono nello stesso intervallo di tempo. L'aumento dell'espressione dei D₃, al pari della sensibilizzazione comportamentale, richiede un precedente danno ai neuroni dopaminergici ed è dipendente dalla stimolazione dei recettori D₁ (Bordet *et al.*, 1997).

E' stato dimostrato che agonisti parziali di tali recettori, in primati non umani, riducono l'incidenza di movimenti involontari abnormi (Bezard *et al.*, 2003), ma anche gli affetti antiparkinsoniani della levodopa (Hsu *et al.*, 2004), mentre è stato dimostrato che la somministrazione di antagonisti dei recettori D₃ in associazione alla levodopa, è in grado di prevenire significativamente l'incidenza di discinesie, senza alterare gli effetti anti-parkinsoniani di quest'ultima (Visanji *et al.*, 2009).

A tal proposito è importante sottolineare che, nei primati non umani, la somministrazione di MPTP, induce, a livello dei gangli della base, una diminuzione del 50% dell'espressione dei recettori D₃, la quale si normalizza dopo trattamento con levodopa negli animali che non sviluppano discinesie, e aumenta invece più del 50% nei primati nei quali queste si presentano (Guigoni *et al.*, 2005).

Oltre nei primati, i movimenti abnormi involontari sono stati studiati nei ratti con lesione unilaterale del sistema nigrostriatale. E' stato evidenziato che gli antagonisti D₃ (come il PG 01037) sono in grado di ridurre l'incidenza di discinesie se somministrati contemporaneamente alla levodopa (Grundt *et al.*, 2005, 2007), effetto che potrebbe

derivare dalle azioni di tali antagonisti sui recettori 5-HT_{1A}, in quanto è stata proposta l'ipotesi che le discinesie possano essere anche concausa del rilascio di DA dai terminali serotoninergici (Grundt *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2005).

Mela *et al.* (2010), nello stesso modello sperimentale, hanno messo in evidenza che l'antagonista D₃ non è in grado di contrastare la manifestazione delle discinesie in ratti trattati cronicamente con levodopa, anche se è in grado di esacerbare il comportamento rotatorio indotto dalla stessa e di attenuare invece i disturbi motori quando somministrato da solo.

L'ipotesi D₃-dipendente sulle discinesie è tuttora oggetto di controversie, in quanto altri neurotrasmettitori e secondi messaggeri, oltre alla DA e alla serotonina, potrebbero essere coinvolti in tale processo. Il sistema oppioidi, infatti, potrebbe contribuire al processo di sensibilizzazione in quanto in modelli animali di discinesie, l'RNA messaggero codificante sia per la pre-proencefalina A che B, è sensibilmente aumentato nello striato (Aubert *et al.*, 2007, Duty e Brotchie, 1997; Gerfen e Young, 1988; Gerfen *et al.*, 1990; Henry *et al.*, 2003; Nisenbaum *et al.* 1994; Voorn *et al.*, 1987; Westin *et al.*, 2001). Gli antagonisti D₃, quindi, potrebbero agire sopprimendo l'incremento della pre-proencefalina A e antagonizzando la manifestazione dei movimenti discinetici (Visanji *et al.*, 2009). Infatti, nei pazienti parkinsoniani, in trattamento con levodopa ma non discinetici, le concentrazioni di pre-proencefalina A a livello striatale, sono ridotte rispetto a quelle dei soggetti discinetici (Calon *et al.*, 2002).

Un ulteriore meccanismo di regolazione potrebbe essere rappresentato dalla DARPP-32, la quale è sensibilmente aumentata nella sua forma fosforilata dopo lesione dei terminali dopaminergici con 6-OHDA e successivo trattamento cronico con levodopa, mediante un meccanismo che sembra dipendente dall'attivazione del recettore D₁ (Picconi *et al.*, 2005).

Inoltre non è ancora chiaro se la sovra-regolazione recettoriale sia il meccanismo chiave alla base della sensibilizzazione. Infatti, alcuni autori ipotizzano che l'incidenza di discinesie successive al trattamento cronico in modelli di Parkinson in primati non umani, sembra accompagnato da cambiamenti funzionali delle proteine G (sub unità GTP γ) legate al recettore D₁ piuttosto che cambiamenti nel numero e quindi nell'espressione di tale recettore (Aubert *et al.*, 2005).

Allo stato attuale, esistono ipotesi particolarmente contrastanti sul ruolo dei recettori D₃ nello sviluppo delle discinesie (Silverdale *et al.*, 2004).

I recettori D₃ nelle dipendenze

Recentemente è stato studiato l'utilizzo di composti attivi sui recettori D₃ nel trattamento di alcune malattie di interesse psichiatrico, tra le quali, in modo particolare, la dipendenza. Studi preclinici hanno evidenziato il ruolo di tali recettori nei comportamenti guidati da stimoli di rinforzo positivo (Le Foll *et al.*, 2002), ed hanno messo in evidenza che la somministrazione di antagonisti di tali recettori, è in grado di attenuare i comportamenti volti alla ricerca del farmaco d'abuso (Ashby *et al.*, 2003; Cervo *et al.*, 2005; Le Foll *et al.*, 2005a; Pak *et al.*, 2006; Thanos *et al.*, 2008; Vorel *et al.*, 2002; Gyertyan e Gal., 2003). Inoltre, antagonisti o agonisti parziali dei recettori D₃ potrebbero alterare gli aspetti motivazionali tipici dei farmaci d'abuso, in quanto, sono in grado di ridurre il pattern di auto-somministrazione (Gilbert *et al.*, 2005; Higley *et al.*, 2011; Orio *et al.*, 2010; Spiller *et al.*, 2008). Gli antagonisti dei recettori D₃ potrebbero perciò essere efficaci nel trattamento delle dipendenze, prevenendo l'assunzione del farmaco d'abuso in seguito a stimoli ad esso associati (Cervo *et al.*, 2005; Gal e Gyertyan 2006; Gilbert *et al.*, 2005; Higley *et al.*, 2011; Khaled *et al.*, 2010), come contesti ambientali (Spiller *et al.*, 2008), farmaci (Achat-Mendes *et al.*, 2010; Andreoli *et al.*, 2003; Gilbert *et al.*, 2005; Heidbreder *et al.*, 2007; Higley *et al.*, 2011, Vorel *et al.*, 2002) e stress (Higley *et al.*, 2011, Vorel *et al.*, 2002); condizioni che sono in grado di promuovere la ricerca del farmaco.

Collins *et al.* (2011), hanno messo in evidenza, nel ratto, che l'esposizione ai farmaci d'abuso sembra essere un fattore responsabile dell'up-regulation dei recettori D₃. Infatti, tali autori hanno dimostrato che il loro numero aumenta nel nucleus accumbens dopo un trattamento cronico con cocaina, ed è associato a sensibilizzazione comportamentale. Inoltre, sembra giocare un ruolo chiave il contesto ambientale nel quale avviene l'assunzione dei farmaci, in quanto l'up-regulation D₃ è stata osservata quando la somministrazione ripetuta di cocaina nei ratti avviene in un contesto ambientale nuovo, ma non nella gabbia di stabulazione (Le Foll *et al.*, 2002).

In generale, se gli antagonisti dei recettori D₃ rimangono farmaci promettenti nel campo delle dipendenze, gli antagonisti dei recettori D₂ non sembrano avere effetti selettivi. Infatti, tali farmaci sembrano essere in grado di agire sugli stimoli indotti da ricompense naturali, riducendo l'intake di cibo (Wise *et al.*, 1978; Corrigall and Coen, 1991; Achat-Mendes *et al.*, 2010), senza agire specificamente sugli aspetti motivazionali collegati alla dipendenza da farmaci.

In uno studio di Di Ciano (2008), l'infusione dell'antagonista D₃ nell'amigdala basolaterale è in grado di ridurre il numero di risposte associate all'auto-somministrazione

di cocaina in una schedula di rinforzo di secondo ordine, suggerendo che il blocco D₃ in tale area riduce l'abilità del rinforzo incondizionato di mantenere il comportamento operante (Di Ciano, 2008). Inoltre, tale studio è stato confermato da uno successivo nel quale, nello stesso paradigma sperimentale, lo stesso antagonista infuso nella stessa area, è stato in grado di ridurre le risposte nella fase di reinstatement (somministrazione del farmaco dopo una fase di astinenza dallo stesso) da nicotina (Khaled *et al.*, 2014). Ulteriori studi sugli effetti del blocco dei recettori D₃ nell'amigdala basolaterale, hanno messo in evidenza che gli antagonisti D₃ non sono in grado di modificare l'auto-somministrazione quando il rinforzo primario è il cibo (Le Foll e Di Ciano, 2014). In aree differenti, come la shell del nucleus accumbens, l'infusione dell'antagonista D₃ blocca il reinstatement da nicotina nel paradigma dell'auto-somministrazione (Di Ciano, 2008), e lo stesso farmaco, quando infuso nella shell o nel core, non è in grado di promuovere i comportamenti volti alla ricerca della cocaina (Schmidt *et al.*, 2006). E' interessante notare che l'abenula laterale, invece, potrebbe essere coinvolta nel reinstatement da farmaci d'abuso, in quanto l'infusione dell'antagonista D₃ in tale area riduce l'intensità del reinstatement indotto da nicotina nel paradigma dell'auto-somministrazione (Khaled *et al.*, 2014). Inoltre, è stato dimostrato che la somministrazione sistemica dell'antagonista D₃ è in grado di bloccare sia l'acquisizione che l'espressione della preferenza spaziale condizionata indotta da cocaina (Le Foll e Di Ciano, 2014), fenomeno che sembra mediato dal coinvolgimento dell'amigdala basolaterale e del nucleus accumbens (Aujla e Beninger, 2004).

Da questa analisi si può evincere che la conoscenza delle differenze alla base della distribuzione e del ruolo dei recettori D₃, non solo potrebbe fornire un valido approccio alla comprensione dei meccanismi alla base della dipendenza, ma anche lo strumento per approfondire le conoscenze su importanti funzioni come quelle motorie e cognitive, le quali potrebbero fornire nuovi target terapeutici per il trattamento di patologie come la malattia di Parkinson, con particolare riferimento alle complicazioni psichiatriche ed essa associate.

Scopo della ricerca

Dalla sua introduzione nel mercato, il PPX ha rappresentato, per i pazienti affetti da malattia di Parkinson, una valida alternativa tra i farmaci già in uso. Questo composto, infatti, si distingue dai farmaci tutt'ora utilizzati per la sua peculiarità d'azione, che è quella di legarsi selettivamente ai recettori dopaminergici D₃ con selettività da 5 a 7 volte rispetto ai recettori D₂ e D₄, unita a quella di possedere scarsa o nessuna affinità per i recettori D₁ (Hubble, 2000; Mierau e Schingnitz, 1992; Piercey *et al.*, 1996).

Nonostante le conoscenze sulle proprietà farmacocinetiche del farmaco siano state accuratamente stabilite, il meccanismo d'azione del PPX non è stato ancora del tutto chiarito. Si ipotizza che esso agisca da un lato a livello della via indiretta striato-pallido-nigrale, mediante un'azione D₂ mediata, dall'altro sulla via diretta striato-nigrale, mediante un'azione mediata dai recettori D₃, la cui sinergia di azione, è ben noto essere efficace nel trattamento dei sintomi motori associati al Parkinson (Piercey, 1998).

Negli studi preclinici, il PPX si è dimostrato efficace sia nel ridurre i deficit motori nei primati non umani, che di indurre turning controlaterale nel ratto. In clinica, si è dimostrato efficace nell'alleviare i sintomi motori, sia in pazienti in stadio lieve-moderato, che avanzato (Hubble, 2000; Lieberman *et al.*, 1997; Mierau e Schingnitz, 1992). I benefici apportati dalla sua azione sono rappresentati dalla possibilità di ritardare l'introduzione in terapia o ridurre la dose giornaliera di levodopa (Lieberman *et al.*, 1997).

Recentemente, la terapia dopaminergica sostitutiva e in particolare il PPX, sono stati associati, in una significativa percentuale di pazienti, all'insorgenza di disturbi della personalità come la sindrome da disregolazione dopaminergica e il disturbo da gioco d'azzardo (Voon *et al.*, 2006), nei quali il coinvolgimento degli agonisti dopaminergici può essere relazionato alla loro affinità di legame per i recettori D₃ (Driver-Dunckley *et al.*, 2003, Dodd *et al.*, 2005). A tal proposito è stata ipotizzata la possibilità dell'esistenza di una correlazione tra tali complicazioni e il tipo di personalità del paziente parkinsoniano. Infatti, è stato evidenziato che gli individui “*sensation-seeking*”, che sono inclini alle dipendenze, manifestano maggiormente i disturbi della personalità associati alla terapia sostitutiva, e che l'incidenza di tali disturbi è maggiore in coloro che presentano storie pregresse di abuso, comportamenti impulsivi/compulsivi preesistenti e alcolismo (Evans *et al.*, 2005).

Sulla base di queste evidenze, lo scopo del presente lavoro è duplice: (i) da un lato verrà studiato il meccanismo d'azione del PPX e il ruolo dei differenti sottotipi recettoriali

dopaminergici, mediante l'utilizzo del modello sperimentale di emiparkinson ottenuto attraverso la lesione del fascio mediale del mesencefalo con la 6-OHDA; (ii) dall'altro sarà studiata la correlazione tra malattia di Parkinson, somministrazione di PPX e incidenza della sindrome da disregolazione dopaminergica, partendo dalle evidenze sperimentali secondo le quali il PPX possiede sufficienti proprietà di rinforzo, tali da indurre auto-somministrazione (Engeln *et al.*, 2013) e preferenza spaziale condizionata (Riddle *et al.*, 2012).

Nella prima parte del nostro lavoro, sarà valutato l'effetto di differenti dosi di PPX da solo o in associazione con i differenti antagonisti selettivi dei recettori dopaminergici D₁, D₂ e D₃ (SCH 39166, eticlopride, S33084 rispettivamente) nell'insorgenza del turning controlaterale e nell'attivazione del gene precoce c-fos, in ratti lesionati con 6-OHDA nel fascio mediale del mesencefalo, drug naive o primed con apomorfina. Partendo dall'evidenza scientifica secondo la quale la stimolazione recettoriale ripetuta si traduce nel fenomeno della sensibilizzazione comportamentale (Robinson e Becker, 1986; Kalivas e Stewart, 1991), sarà studiata la risposta comportamentale alla somministrazione di PPX da solo o in associazione all'antagonista dei recettori D₃, S33084, in ratti precedentemente sensibilizzati alla levodopa.

Nella seconda parte del nostro lavoro, sarà valutata la capacità del PPX di indurre preferenza spaziale condizionata in un modello sperimentale di Parkinson ottenuto mediante la lesione bilaterale dei terminali dopaminergici a livello dello striato dorsolaterale. La scelta di questo modello è dovuta al fatto che tale lesione non coinvolge lo striato ventrale. Gli esperimenti saranno condotti in tre ceppi differenti di ratti allo scopo di conoscere se, il possedere un fenotipo impulsivo e incline alla dipendenze rappresentato dal ceppo inbred Lewis, come ampiamente dimostrato in letteratura (Anderson & Woolverton, 2005; Madden *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2014), possa risultare in differenze comportamentali nell'acquisizione e nell'espressione della CPP rispetto al ceppo non impulsivo, rappresentato dal ceppo inbred Fischer 344, e rispetto alla popolazione generale rappresentata dal ceppo outbred Sprague Dawley. Inoltre, sarà valutata la preferenza spaziale condizionata, negli stessi ceppi di animali sani, in seguito all'infusione del farmaco direttamente nella shell del nucleus accumbens, area implicata nella processazione delle proprietà di rinforzo dei farmaci d'abuso (Pontieri *et al.*, 1996; Bassareo e Di Chiara, 1997; Di Chiara, 1998; Di Chiara, 2002; Di Chiara *et al.*, 2004; Di Chiara, 2005; Kelly e Berridge, 2002).

Animali

In questo studio sono stati utilizzati ratti maschi di tre ceppi differenti (Charles River, Calco, Milano). In particolare, per la valutazione del profilo farmacologico e degli effetti antiparkinsoniani dell'agonista dei recettori dopaminergici D₂/D₃ PPX, sono stati usati ratti Sprague Dawley (280-320 g), mentre per la valutazione delle proprietà gratificanti, sono stati utilizzati ratti maschi dei due ceppi inbred Fischer 344 (280-320 g, circa 12 settimane di età) e Lewis (280-320 g, circa 10 settimane di età) e animali maschi del ceppo outbred Sprague Dawley (280-320 g, circa 9 settimane di età). Il giorno del loro arrivo, tutti i ratti sono stati stabulati in gruppi di sei, in gabbie di polycarbonato, aventi il fondo ricoperto di segatura e sono stati mantenuti in un ambiente con luce (8:00 – 20:00) e clima controllati (temperatura 23° C, umidità 60%), con acqua e cibo *ad libitum*. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati durante il ciclo di luce (a partire dalle ore 10:00 a.m.), e sono stati condotti secondo le direttive della Comunità Europea in materia di sperimentazione sugli animali (2010/63/UE L 276 20/10/2010), e le linee guida approvate dal Comitato Etico per la salute e l'uso degli animali dell'Università degli Studi di Cagliari. Gli animali sono stati usati per una sola procedura sperimentale ed è stato fatto tutto il possibile per evitare loro qualsiasi inutile sofferenza.

Effetti antiparkinsoniani del pramipexolo

Lesione unilaterale nel fascio mediale del mesencefalo

Trenta minuti prima della procedura chirurgica, gli animali sono stati trattati con desimipramina (10 mg/kg i.p.), inibitore del reuptake della noradrenalina, allo scopo di preservare i neuroni noradrenergici, e anestetizzati con un cocktail (0.85 ml/kg, i.p.) contenente ketamina (100 mg/ml), xilazina (100 mg/ml) e acepromazina (10 mg/ml) disciolti in soluzione fisiologica. Gli animali sono stati successivamente sistemati su un apparecchio stereotassico (Kopf Instruments, Tujunga, CA) e infusi unilateralmente con la neurotossina 6-idrossidopamina (6-OHDA) (8µg/4µl disciolta in soluzione fisiologica contenente acido ascorbico allo 0.05%) nel fascio mediale del mesencefalo secondo le seguenti coordinate: A.P. = -2.2, M.L. = +1.5, D.V. = -7.8, secondo l'atlante Pellegrino *et al.* (1979). L'infusione della 6-OHDA (1 µl/min) è stata realizzata utilizzando una cannula di acciaio

inossidabile, collegata mediante un tubicino di polietilene ad una siringa Hamilton (10 µl) posizionata su una pompa da microinfusione. Dopo l'infusione, la cannula è stata mantenuta in posizione per ulteriori 2 minuti, allo scopo di consentire la completa diffusione della neurotossina nel sito di infusione ed evitare che essa possa diffondere in altre aree nel momento dell'estrazione della cannula dal cervello. Al termine della procedura chirurgica, i ratti sono stati monitorati fino alla ripresa della coscienza e sistemati nello stabulario. Dal giorno dopo la lesione, gli animali sono stati monitorati tutti i giorni allo scopo di valutarne lo stato di salute, in quanto, come ampiamente documentato, la lesione con 6-OHDA induce afagia, anche se di modesta entità. Per tale motivo, a tutti i ratti, è stato aggiunto al cibo standard frutta e cereali ed eventualmente, allo scopo di evitare il possibile deperimento organico, sono stati trattati con saccarosio intragastrico e soluzione fisiologica intraperitoneale. Inoltre, quotidianamente i ratti sono stati manipolati allo scopo di abituarli allo sperimentatore. Due settimane dopo la lesione, gli animali sono stati suddivisi nei vari gruppi sperimentali e trattati secondo i differenti protocolli sperimentali.

Il modello sperimentale di emiparkinson, ottenuto nel ratto mediante l'infusione unilaterale di 6-OHDA nel fascio mediale del mesencefalo, è un metodo ampiamente utilizzato dalla comunità scientifica, anche se non è in grado di riprodurre fedelmente tutte le caratteristiche cliniche della patologia, in quanto non coinvolge il sistema olfattorio, il locus cereuleus e alcune aree ventrali, e non mette in evidenza la formazione di corpi di Lewy. L'infusione unilaterale della neurotossina 6-OHDA in tale area, causa in primo luogo la morte dei neuroni dopaminergici a livello della sostanza nera e dell'area ventrale del tegmento (Deumens *et al.*, 2002) ed è seguita da (i) una totale deplezione dopaminergica dello striato ipsilaterale alla lesione, (ii) una supersensibilità recettoriale postsinaptica nello striato ipsilaterale alla lesione e (iii) l'insorgenza di turning in seguito alla stimolazione dopaminergica. Tali fenomeni sono il risultato di uno sbilanciamento delle concentrazioni di DA tra il lato leso e quello sano, il quale si traduce in uno stato di asimmetria posturale, che causa una torsione spontanea ipsilaterale alla lesione (Deumens *et al.* 2002).

Il modello del turning, è tutt'ora utilizzato nella sperimentazione preclinica per la valutazione degli effetti antiparkinsoniani dei farmaci. Nella Figura 5, è illustrato schematicamente il processo alla base dell'insorgenza del comportamento rotatorio: la somministrazione di un farmaco come l'anfetamina, la quale agisce aumentando il rilascio di DA dai terminali e dalle vescicole sinaptiche, induce turning ipsilaterale alla lesione a

causa dello sbilanciamento delle concentrazioni di DA, che sono predominanti a livello del lato sano. Contrariamente, agonisti dei recettori dopaminergici come l'apomorfina, inducono turning contro laterale alla lesione che deriva dall'aumento del numero (sensibilizzazione) dei recettori nel lato interessato dalla lesione (Deumens *et al.*, 2002). E' stato precedentemente dimostrato che lesioni di moderata entità a carico neuroni dopaminergici sono accompagnate dall'insorgenza del turning dopo somministrazione di anfetamina ma non apomorfina. La risposta all'apomorfina è un indicatore di una marcata ed estesa lesione dopaminergica (Hudson *et al.*, 1993). Lo studio comportamentale degli effetti indotti dalla lesione unilaterale del fascio mediale del mesencefalo, inoltre, è spesso effettuato mediante numerosi test, nei quali si valutano i deficit motori a livello degli arti contro laterali alla lesione e il grado di acinesia (Deumens *et al.*, 2002).

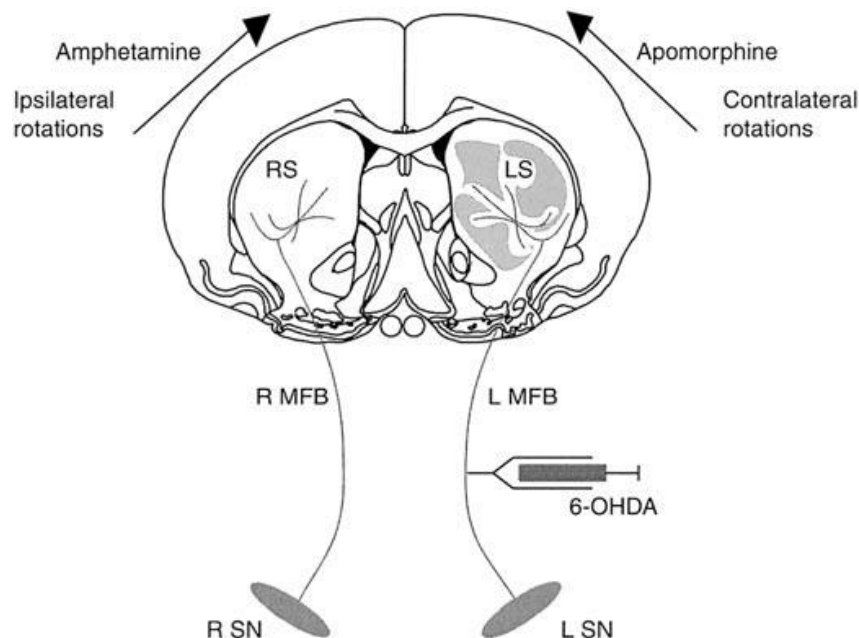


Figura 5. Rappresentazione schematica degli effetti indotti dall'infusione di 6-OHDA nel fascio mediale del mesencefalo e del turning indotto dalla somministrazione di anfetamina o apomorfina. L'area grigia rappresenta la porzione interessata dalla perdita dei neuroni dopaminergici nello striato ipsilaterale alla lesione. La somministrazione di anfetamina induce turnign ipsilaterale alla lesione, mentre l'apomorfina induce turning controlaterale alla lesione. (Deumens *et al.*, 2002).

Valutazione del comportamento rotatorio

La somministrazione di agonisti dopaminergici, induce nel ratto con lesione del fascio mediale del mesencefalo, turning controlaterale. Per la valutazione quantitativa del turning, gli animali sono sistemati in semisfere di plexiglas 30 minuti prima della

procedura sperimentale, collegati ad un sistema di rotametri automatici (Carnegie Medicine, Sweden), mediante un corpetto che segue i loro movimenti durante la durata dell'esperimento, e somministrati con i differenti trattamenti farmacologici in base alla suddivisione nei diversi gruppi sperimentali.

Ratti primed: due settimane dopo la lesione con 6-OHDA, i ratti sono stati trattati con apomorfina (0.5 mg/kg s.c.) (priming). Gli animali che, in risposta all'apomorfina, compiono meno di 150 giri in un ora, vengono esclusi dagli esperimenti.

Allo scopo di valutare il ruolo dei differenti recettori dopaminergici D₁, D₂ e D₃ nell'espressione del turning contro laterale indotto da differenti dosi di PPX, il farmaco è stato somministrato da solo o in associazione con antagonisti selettivi di tali recettori. Per bloccare i recettori D₁ è stato utilizzato l'SCH 39166, per i recettori D₂ l'eticlopride, mentre per bloccare i recettori D₃ l'S33084. Tre giorni dopo il *priming*, gli animali vengono suddivisi nei differenti gruppi sperimentali e trattati come segue:

[Salina (1 ml/kg s.c.) + PPX (0.035 mg/kg s.c., n= 5; 0.1 mg/kg s.c., n= 12; 0.35 mg/kg s.c., n= 7)]; [SCH 39166 (0.1 mg/kg s.c.) + PPX (0.035 mg/kg s.c., n= 5; 0.1 mg/kg s.c., n= 6; 0.35 mg/kg s.c., n= 6)]. Gli animali di questo gruppo sperimentale, due ore e mezza dopo i differenti trattamenti farmacologici, sono stati anestetizzati e sacrificati per l'analisi immunoistochimica del *c-fos*.

[Salina (1 ml/kg s.c.) + PPX (0.1 mg/kg s.c., n=8)]; [Eticlopride (0.1 mg/kg s.c.) + PPX (0,1 mg/kg s.c. n=8)];

[Salina (1 ml/kg s.c.) + PPX (0.1 mg/kg s.c., n=8)]; [S33084 (0.5 mg/kg s.c.) + PPX (0,1 mg/kg s.c. n=10)].

Ratti drug naive: due settimane dopo la lesione con 6-OHDA, i ratti vengono alloggiati nelle semisfere per la valutazione del comportamento rotatorio e somministrati con soluzione fisiologica al posto di apomorfina. Tre giorni dopo, i ratti vengono somministrati come segue:

[Salina (1 ml/kg s.c.) + PPX (0.35 mg/kg s.c., n= 4); SCH 39166 (0.1 mg/kg s.c.) + PPX (0.35 mg/kg s.c., n= 4)]. Due ore e mezza dopo, gli animali sono stati sacrificati per l'analisi immunoistochimica del *c-fos*.

Trattamento cronico con levodopa: due settimane dopo la lesione con 6-OHDA, i ratti vengono trattati cronicamente con levodopa (6 mg/kg s.c.) + benserazide (6 mg/kg s.c.) (n=9) o salina (1 ml/kg s.c.) (n=8), una volta al giorno per la durata di 19 giorni, durante il quale è stato registrato, a giorni alterni, il turning contro laterale, in accordo con

il protocollo di Pinna *et al.* (2006). Due giorni dopo la fine del trattamento cronico, gli animali sono stati suddivisi nei differenti gruppi sperimentali e trattati come segue:

[salina (1 ml/kg s.c.) + PPX (0.05 mg/kg s.c., n= 8); S33084 (0.5 mg/kg s.c.) + PPX (0.05 mg/kg s.c., n= 9)].

Il trattamento è stato effettuato ogni tre giorni per un totale di tre somministrazioni.

Valutazione immunoistochimica del c-fos

In questo studio è stata quantificata l'espressione del gene c-fos, poichè la sua attivazione è conseguenza della stimolazione dei recettori dopaminergici D₁ nelle aree striatali.

Due ore e mezzo dopo la somministrazione del PPX, sia i ratti primed che i drug-naive, sono stati anestetizzati profondamente con Equitesin (0.97 g pentobarbitale, 4.25 g cloralio idrato, 2.1 g MgSO₄, 42.8 ml glicol propilenico, 11.5 ml 90% etanolo/100 ml; 5 ml/kg i.p.) e perfusi transcardialmente con 100 ml di soluzione fisiologica e 250 ml di paraformaldeide al 4% in tampone fosfato a pH 7.4 (4°C). I cervelli sono stati post-fissati per 24 ore in paraformaldeide al 4% e tagliati al vibratomo in sezioni coronali di 40 micron ciascuna e processate per l'analisi immunoistochimica del c-fos mediante incubazione in anticorpo primario (cFos, 1:2000, anti-cFos policlonale IgG prodotto in sheep; Millipore, USA; TH, 1:1000). La reazione è stata visualizzata mediante l'anticorpo secondario biotinilato (1:700, donkey anti-sheep IgG biotin-SP-conjugate, Jackson ImmunoResearch, UK) ed il metodo standard avidina-biotina perossidasi (Vectastain ABC kit, Vector) utilizzando la 3-3' diamino benzidina come substrato cromogeno (DAB solution, Sigma-Aldrich, Italia). Le immagini delle fettine, montate successivamente su vetrino mediante l'uso dell'Eukitt (Fluka, Sigma-Aldrich, Italy) sono state acquisite con microscopio Zeiss AxioScopeA1 equipaggiato con l'obiettivo 20X/0,45 e 40X/0,65 Zeiss N-Acroplan e scannerizzate ad alta risoluzione (Super Coolsan 9000ED, Nikon) con il settaggio a 4000 dpi. In sezioni adiacenti, l'immunoreattività al c-fos è stata quantificata come conte /mm² di nuclei c-fos positivi nelle aree interessate all'analisi. Il numero dei nuclei c-fos positivi è stato determinato mediante l'uso del software IMAGEJ in un campo di osservazione pari a 520 x 390 µm (800 x 600 px)

Proprietà gratificanti del pramipexolo

Lesione bilaterale dello striato dorsolaterale

I ratti, pretrattati con desimipramina (10 mg/kg i.p.), sono stati anestetizzati come già precedentemente descritto e posizionati sull'apparecchio stereotassico David Kopf e infusi bilateralmente nello striato dorso laterale alle coordinate AP=+1.0, L=±3.4, V=-4.8 per i ratti del ceppo Lewis e Sprague Dawley e AP=+0.8, L=±3.4, V=-4.5 per i ratti del ceppo Fischer 344 secondo l'atlante di Paxinos e Watson (IV ed., 1998) con la neurotossina 6-OHDA (7.5 µg/2 µl in soluzione fisiologica contenente 0.05 % di acido ascorbico), alla velocità di 0.5 µl/min. I gruppi di controllo hanno ricevuto il veicolo (soluzione fisiologica contenente 0.05 % di acido ascorbico), al posto della 6-OHDA alle stesse coordinate.

La dose di 6-OHDA utilizzata e l'area dello striato dorso laterale sono stati scelti sulla base degli studi del gruppo di Riddle *et al.* (2012). E' stato scelto questo protocollo di lesione in quanto permette di lasciare intatto lo striato ventrale. Gli esperimenti di comportamento sono stati realizzati a partire da tre settimane dopo la lesione con la 6-OHDA. Durante questo periodo, gli animali sono stati seguiti tutti i giorni allo scopo di verificarne lo stato di salute in quanto, come già precedentemente riportato, la lesione striatale con 6-OHDA induce afagia. Per contrastare il calo ponderale sono stati aggiunti alla dieta standard, frutta e cereali, e somministrazioni di saccarosio intragastriche soluzione fisiologica intraperitoneale. Inoltre, i ratti sono stati manipolati quotidianamente allo scopo di abituarli allo sperimentatore.

L'infusione bilaterale di 6-OHDA nello striato potrebbe rappresentare un modello con caratteristiche simili alla patologia umana. A causa dell'estensione di tale area, numerosi studi preclinici hanno messo in evidenza la necessità di mappare le possibili aree interessate dalla lesione, in quanto a livello anatomico e funzionale, esse appaiono significativamente differenti tra loro (Figura 6).

La porzione ventro laterale riceve input senso-motori dalla neocorteccia e vi si ritrovano le afferenze dopaminergiche che originano solo dalla sostanza nera. La porzione dorso-mediale, invece, riceve input dalle aree corticali e dal sistema limbico, e proiezioni che originano sia dalla sostanza nera che dall'area ventrale del tegmento. Da ciò deriva che lesioni che coinvolgono la porzione ventromediale, si traducono in deficit nell'orientamento senso motorio e nell'abilità di compiere movimenti fini; mentre lesioni che coinvolgono la porzione dorso mediale, hanno principalmente effetto sull'esecuzione

dei movimenti (Deumens *et al.*, 2002). In particolare, la porzione dorso-laterale dello striato, riceve input dalle aree corticali deputate al controllo senso-motorio ed principalmente implicata nella regolazione dei processi alla base dell'inizio del movimento.

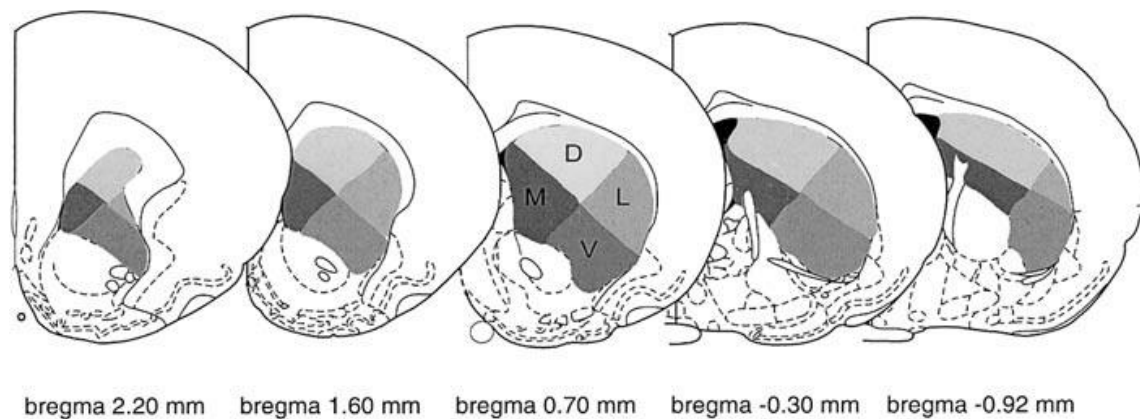


Figura 6. Illustrazione schematica di sezioni coronali distribuite in senso rostro-caudale che mostrano le suddivisioni interne nello striato. Le differenti scale di grigio rappresentano 4 differenti aree del complesso caudato-putamen: dorsale (D), mediale (M), laterale (L) e ventrale (V) (Deumens *et al.*, 2002).

L'infusione bilaterale di 6-OHDA nei terminali dorso laterali induce una lesione in senso retrogrado alla sostanza nera, mentre non diffonde allo striato ventromediale. A livello comportamentale, si traduce sia in deficit motori, sia in un aumento del tempo necessario a compiere un movimento volontario (Deumens *et al.*, 2002). Inoltre, la lesione parziale, ma non totale dello striato, a prescindere dalla porzione interessata, potrebbe indurre fenomeni compensatori atti a contrastare la perdita dei neuroni dopaminergici (Kirik *et al.*, 1998).

Impianto di cannule croniche nella shell del nucleus accumbens

Allo scopo di valutare il ruolo del nucleus accumbens shell nell'acquisizione delle proprietà gratificanti del PPX, differenti gruppi sperimentali dei tre ceppi di ratti, previa anestesia (vedere sopra), sono stati impiantati bilateralmente con cannule croniche nella shell del nucleus accumbens (coordinate AP=+1.8, L=±1.1, V=-7.8 ceppi SD e LEW; AP=+1.2, L=±1.1, V=-7.5, ceppo F344), secondo l'atlante Paxinos e Watson (1998). Dopo le procedure chirurgiche, gli animali sono stati quotidianamente manipolati ed è stata controllato lo stato di salute e la pervietà delle cannule.

Allo scopo di effettuare la ricostruzione dei siti di infusione, alla fine della procedura sperimentale, gli animali sono stati anestetizzati profondamente con Equitesin (0.97 g pentobarbitale, 4.25 g cloralio idrato, 2.1 g MgSO₄, 42.8 ml glicol propilenico, 11.5 ml 90% etanolo/100 ml; 5 ml/kg i.p.) e perfusi transcardialmente con 100 ml di soluzione fisiologica e 100 ml di formalina (10%). I cervelli post-fissati per 24 ore in formalina (10%), e tagliati al vibratomo in sezioni coronali di 40 micron ciascuna. Le fettine contenenti la shell del nucleus accumbens sono state processate per la valutazione, mediante osservazione al microscopio ottico. La traccia della cannula è stata ricostruita mediante l'atlante Paxinos e Watson (1998). I ratti in cui non è possibile ricostruire con precisione la traccia della cannula o con sito di infusione errato, sono stati esclusi dallo studio.

Il paradigma sperimentale della preferenza spaziale condizionata

Il paradigma sperimentale della preferenza spaziale condizionata, è un metodo sperimentale ampiamente validato per lo studio delle proprietà di rinforzo dei farmaci. I box per la valutazione, consistono di due compartimenti rettangolari in Plexiglas (30x15 cm; h 36 cm) separati da una porta a ghigliottina. L'interno dei due compartimenti è diverso sia a livello visivo che tattile. Un compartimento è costituito da pareti bianche a righe orizzontali nere e pavimento con fine grata metallica, mentre l'altro è costituito da pareti nere e righe verticali bianche e pavimento bianco liscio coperto con della lettiera (Figura 7).

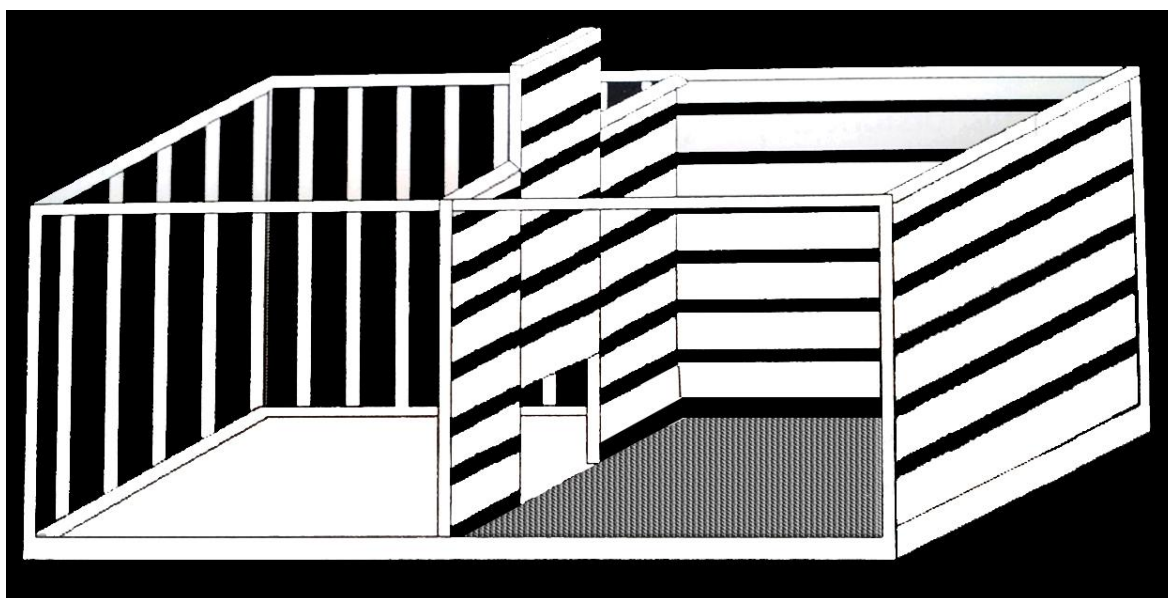


Figura 7. Rappresentazione schematica dei box utilizzati per lo studio della CPP

La procedura sperimentale consiste in tre distinte fasi: pre-test, condizionamento (acquisizione) e test (espressione).

Pre-test (giorno 1). In questa fase viene misurata la “preferenza spaziale incondizionata o spontanea” dell’animale per ciascun compartimento. Infatti, a tale scopo la porta a ghigliottina è mantenuta alzata, l’animale è lasciato libero di esplorare i due compartimenti per 15 minuti durante i quali si registra il tempo che l’animale passa in ciascun compartimento. Questo tempo indica la “preferenza spaziale incondizionata o spontanea” dell’animale per ciascun compartimento.

Condizionamento (giorni 2-9). In questa fase vengono effettuati i trattamenti farmacologici che consistono nel somministrare l’animale con il farmaco in esame e confinarlo, per un determinato tempo, nel compartimento non preferito determinato il giorno del pre-test, in modo da permettere l’associazione tra l’effetto del farmaco e l’ambiente in cui esso è somministrato. A tale scopo la porta a ghigliottina è mantenuta abbassata. A giorni alterni (giorni 2,4,6,8 o 3,5,7,9), gli animali vengono condizionati per 45 minuti, 30 minuti dopo il trattamento con il PPX o la soluzione fisiologica (animali di controllo). E’ stato scelto un protocollo che prevede 4 condizionamenti al farmaco. Il numero di animali trattati con il farmaco o con la soluzione fisiologica, sono controbilanciati nelle diverse sessioni di trattamento.

In differenti gruppi di ratti, il PPX è stato somministrato per via sistemica o infuso direttamente nella shell del nucleus accumbens come descritto di seguito. Sia nel protocollo che prevede il PPX sistemico, che per quello del PPX nella shell del nucleus accumbens, il farmaco è sempre stato associato al compartimento non preferito determinato il giorno del pre-test, mentre la soluzione fisiologica è sempre stata associata al compartimento preferito.

PPX sistemico: [PPX (1 mg/kg s.c., SD n=6; LEW n=8; F344 n=5)] o salina [(1 ml/kg s.c., SD n=4; LEW n=4; F344 n=4)];

PPX in nucleus accumbens shell: [PPX (5 µg/0.5µl x lato, SD n=4; LEW n=4; F344 n=4)] o salina [(1 µg/0.5µl x lato, SD n=4; LEW n=4; F344 n=4)];

I tempi sono stati scelti sulla base del fatto che il PPX induce nella prima mezz’ora uno stato di ipomotilità; mentre a 30 minuti dalla sua somministrazione, induce attivazione comportamentale riconoscibile dalla presenza di stereotipie orofacciali, come sniffing confinato e liking come mostrato da Riddle *et al.* (2012). E’ stata effettuata una valutazione del comportamento durante tutti i condizionamenti.

Test (giorno 10). In questa fase la porta a ghigliottina è mantenuta alzata come nella fase di pre-test e gli animali sono liberi di esplorare per 15 minuti i due compartimenti; il tempo trascorso in ciascun compartimento è stato registrato.

La preferenza o l'avversione verrà misurata mediante la differenza tra il tempo trascorso nel compartimento associato al farmaco (non preferito) il giorno del test (giorno 10) e quello trascorso nello stesso compartimento nella fase di pre-test (giorno 1).

Immunoistochimica per la tirosina idrossilasi

Allo scopo di valutare il grado di lesione nello striato dorso-laterale, è stata quantificata la tirosina idrossilasi come marker identificativo dei neuroni dopaminergici residui in seguito all'infusione di 6-OHDA. L'analisi è stata effettuata sia a livello dello striato che della sostanza nera. Alla fine della procedura sperimentale della preferenza spaziale condizionata, gli animali lesionati bilateralmente nello striato dorsolaterale, sono stati anestetizzati profondamente con Equitesin (0.97 g pentobarbitale, 4.25 g cloralio idrato, 2.1 g MgSO₄, 42.8 ml glicol propilenico, 11.5 ml 90% etanolo/100 ml; 5 ml/kg i.p.) e perfusi transcardialmente con 100 ml di soluzione fisiologica e 250 ml di paraformaldeide al 4% disciolta in tampone fosfato a pH 7.4, a 4° C. I cervelli sono stati post-fissati per 24 ore in paraformaldeide al 4% poi tagliati al vibratomo in sezioni coronali di 40 micron ciascuna. Le fettine contenenti lo striato, la sostanza nera e l'area ventrale del tegmento sono state processate per l'analisi immunoistochimica della tirosina idrossilasi (TH), enzima limitante della sintesi della DA, mediante incubazione con l'anticorpo primario monoclonale (mouse anti TH monoclonale, Sigma Milano, diluizione 1:1000) per 41 ore a 4°C. L'anticorpo primario è stato poi visualizzato tramite un anticorpo secondario biotinilato (donkey biotinilato anti mouse IgG, Jackson Immuno Research, diluizione 1:500) ed il metodo standard avidina-biotina perossidasi (Vectastain ABC kit, Vector) utilizzando la 3-3' diamino benzidina come substrato cromogeno. Le immagini delle fettine montate successivamente su vetrino mediante l'Eukitt (Fluka, Sigma-Aldrich, Italy), sono state acquisite con uno scanner ad alta risoluzione per preparati istologici (Super Coolsan 9000ED, Nikon). Mediante il software IMAGEJ la lesione striatale è stata valutata come variazione percentuale della densità ottica (OD) all'interno dell'area lesionata rispetto ai controlli. La lesione della sostanza nera è stata invece valutata mediante la percentuale delle conte dei neuroni TH positivi per area lesa rispetto a quella non lesa.

Farmaci

La 6-OHDA-HCl, la desipramina, la R(-)-apomorfina HCl sono stati acquistate da Sigma-Aldrich (Milano, Italia); SCH 39166, pramipexolo diidrocloreidrato ed eticlopride cloridrato sono stati acquistati da Tocris Bioscience (Milano, Italia). L'S33084 è stato gentilmente donato dal Prof. Roberto Maggio, dell'Università di L'Aquila. A parte l'S33084 che è stato sciolto in DMSO al 3% in soluzione fisiologica, tutti gli altri farmaci sono stati disciolti in salina. I differenti farmaci sono stati iniettati in un volume di 0.3 ml/100 g di peso corporeo se somministrazioni i.p. o in un volume di 0.1 ml/100 g d. di peso corporeo per le somministrazioni s.c.

Valutazione statistica

Tutti i dati ottenuti sono stati analizzati mediante il programma Statistica 8 per Windows (Stat Soft Inc, Tulsa, OK, US). Come descritto nei risultati, sulla base del tipo di esperimento condotto, è stata effettuata l'analisi ANOVA a una o più vie seguita dall'analisi post hoc al Tukey HSD o Fisher LSD. Sono stati considerati significativi solo i risultati con $p < 0.05$.

Effetti antiparkinsoniani del pramipexolo

Ruolo dei recettori dopaminergici D₁ sul turning controlaterale indotto dal pramipexolo e sull'immunoreattività al c-fos

La figura 8 mostra il turning controlaterale indotto dal PPX, da solo o in associazione con l'antagonista dei recettori dopaminergici D₁ SCH 39166, in ratti primed con apomorfina (0.5 mg/kg s.c.) e drug-naïve. Come si evince dalla figura, il PPX induce turning controlaterale alla dose di 0.1 e 0.35 mg/kg s.c. nei ratti primed, mentre nessun effetto è stato osservato in risposta alla dose di 0.035 mg/kg s.c. nei ratti primed e nei ratti drug naïve.

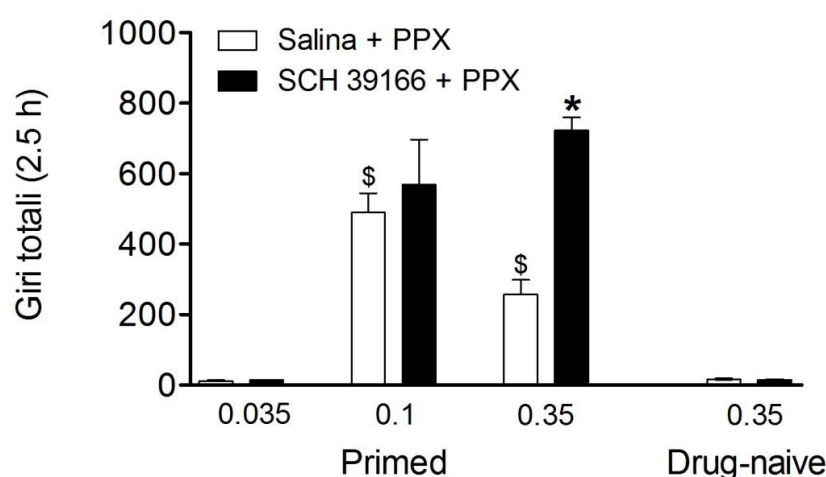


Figura 8. Effetto della somministrazione dell'antagonista dei recettori dopaminergici D₁ SCH 39166 (0.1 mg/kg s.c.) sul turning controlaterale indotto da differenti dosi di PPX (0.035, 0.1 e 0.35 mg/kg s.c.) in animali primed con apomorfina (0.5 mg/kg s.c.) e drug-naïve. L'SCH 39166 è stato somministrato 5 min prima del PPX. Le colonne rappresentano la media \pm SEM del numero di rotazioni controlaterali effettuate dagli animali in 2.5 h dopo la somministrazione di PPX (* $p < 0.05$ vs controllo del corrispondente gruppo; \$ $p < 0.05$ vs 0.035 del corrispondente gruppo, al Tukey post hoc test).

Il pretrattamento con l'SCH 39166 (0.1 mg/kg s.c.), non influenza il turning controlaterale indotto dal PPX alle dosi di 0.035 e 0.1 mg/kg s.c., mentre potenzia quello ottenuto in risposta a 0.35 mg/kg s.c. L'ANOVA a due vie mette in evidenza un effetto del pretrattamento ($F_{1,36}=7.27$, $p < 0.05$), del trattamento ($F_{2,36}=19.10$, $p < 0.05$), e dell'interazione pretrattamento \times trattamento ($F_{2,36}=4.81$, $p < 0.05$). Il post-hoc (test di Tukey), mette in evidenza un effetto del PPX alla dose di 0.1 e 0.35 mg/kg ($p < 0.05$) e un

effetto dell'SCH 39166 quando il PPX è somministrato alla dose di 0.35 mg/kg s.c. ($p < 0.05$), mentre nessun effetto è stato osservato negli animali drug-naive ($p > 0.05$) (Figura 8).

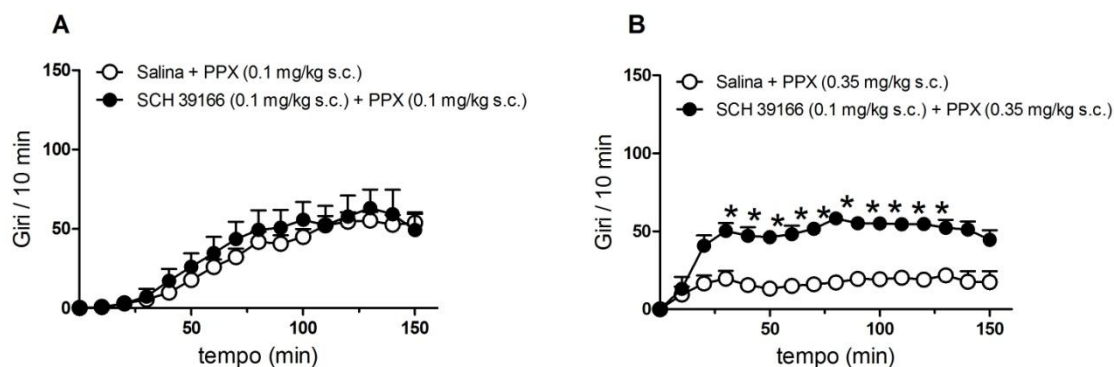


Figura 9. Effetto della somministrazione dell'antagonista dei recettori dopaminergici D₁ SCH 39166 (0.1 mg/kg s.c.) sul turning controlaterale indotto dal PPX (0.1 e 0.35 mg/kg s.c., pannelli A e B) in animali primed con apomorfina (0.5 mg/kg s.c.). L'SCH 39166 è stato somministrato 5 min prima del PPX. I dati sono espressi come media \pm SEM del numero di rotazioni controlaterali effettuate dagli animali in 2.5 h dopo la somministrazione di PPX, registrate ogni 10 min ($*p < 0.05$ vs controllo del corrispondente gruppo al Tukey *post hoc* test).

La figura 9 mostra la *time-course* del turning controlaterale indotto dal PPX (0.1 e 0.35 mg/kg s.c.), somministrato da solo o in associazione all'antagonista dei recettori dopaminergici D₁ SCH 39166 (0.1 mg/kg s.c.). L'ANOVA a due vie mette in evidenza, per la dose di 0.1 mg/kg s.c., un effetto del *tempo* ($F_{14,280}=44.77$, $p < 0.05$) (Fig. 9, pannello A), mentre per la dose di 0.35 mg/kg s.c., è evidenziato un effetto del *tempo* ($F_{14,154}=6.04$, $p < 0.05$), del *pretrattamento* ($F_{1,11}=69.53$, $p < 0.05$) e dell'interazione *pretrattamento* \times *tempo* ($F_{14,154}=2.53$, $p < 0.05$). Il *post-hoc* (test di Tukey) rivela un effetto del *pretrattamento* con SCH 39166 tra 30 e 120 min ($p < 0.05$) (Figura 9, pannello B).

Come mostrato nella figura 10, la somministrazione di PPX, da solo o in associazione con l'antagonista dei recettori dopaminergici D₁ SCH 39166 (0.1 mg/kg s.c.), non è in grado di indurre l'attivazione del *c-fos*, in nessuno dei gruppi sperimentali (Figura 10).

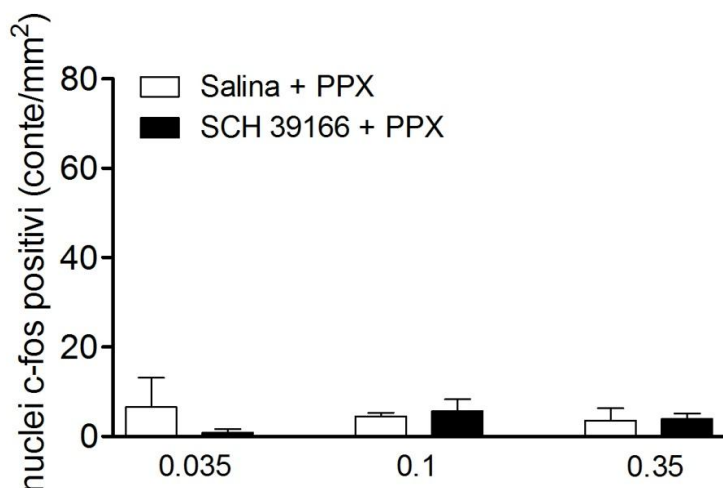


Figura 10. Induzione dell'espressione del *c-fos* dopo somministrazione di PPX (0.035, 0.1 e 0.35 mg/kg s.c.) da solo o in associazione con l'antagonista dei recettori dopaminergici D₁ SCH 39166 (0.1 mg/kg s.c.), in animali primed con apomorfina (0.5 mg/kg s.c.). L'SCH 39166 è stato somministrato 5 min prima del PPX. Gli animali sono stati sacrificati 2.5 h dopo la somministrazione di PPX. Le colonne rappresentano la media \pm SEM delle conte per mm².

Ruolo dei recettori dopaminergici D₂ sul turning controlaterale indotto dal pramipexolo

Come mostrato nella figura 11, la somministrazione dell'antagonista dei recettori dopaminergici D₂ eticlopride (0.1 mg/kg s.c.), riduce drasticamente il turning controlaterale indotto dal PPX (0.1 mg/kg s.c.) (Figura 11). L'ANOVA a una via mette in evidenza un effetto del *pretrattamento* ($F_{1,14}=40.26$, $p<0.05$), il quale è suffragato dall'analisi *post-hoc* ($p<0.05$ al test di Tukey).

La figura 12 mostra la *time-course* del turning controlaterale indotto dal PPX (0.1 mg/kg s.c.), da solo o in associazione all'eticlopride (0.1 mg/kg s.c.). L'ANOVA a due vie mostra un effetto del *pretrattamento* ($F_{1,14}=40.49$, $p<0.05$), del *tempo* ($F_{14,196}=26.16$, $p<0.05$) e dell'interazione *pretrattamento x tempo* ($F_{14,196}=25.54$, $p<0.05$). Il *post-hoc* (test di Tukey), rivela un effetto significativo dell'eticlopride da 70 a 150 min ($p<0.05$).

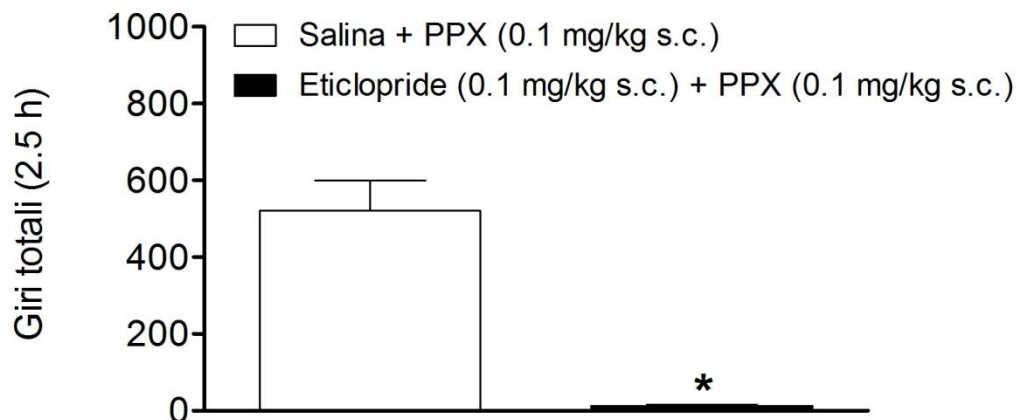


Figura 11. Effetto della somministrazione dell'antagonista dei recettori dopaminergici D_2 eticlopride (0.1 mg/kg s.c.), somministrato 5 min prima del PPX, sul turning controlaterale indotto da 0.1 mg/kg s.c. di PPX in animali primed con apomorfina (0.5 mg/kg s.c.). Le colonne rappresentano la media \pm SEM del numero di rotazioni controlaterali effettuate dall'animale in 2.5 h dopo la somministrazione di PPX (* $p < 0.05$ vs controllo del corrispondente gruppo, *post hoc* test di Tukey).

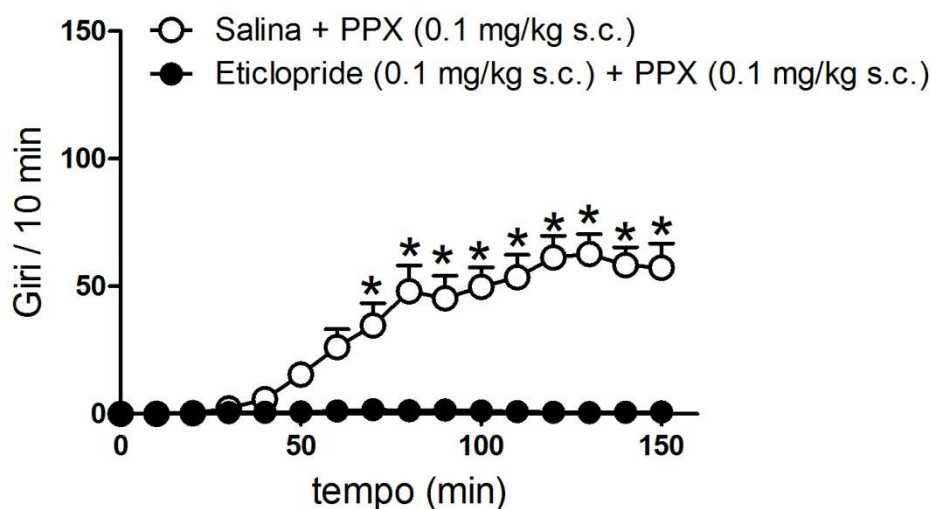


Figura 12. Effetto della somministrazione dell'antagonista dei recettori dopaminergici D_2 eticlopride (0.1 mg/kg s.c.) sul turning controlaterale indotto da PPX (0.1 mg/kg s.c.) in animali primed con apomorfina (0.5 mg/kg s.c.). L'eticlopride è stato somministrato 5 min prima del PPX. Le colonne rappresentano la media \pm SEM del numero di rotazioni controlaterali effettuate dall'animale nelle 2.5 h successive alla somministrazione di PPX, registrate ogni 10 min (* $p < 0.05$ vs controllo del corrispondente gruppo, *post hoc* test di Tukey).

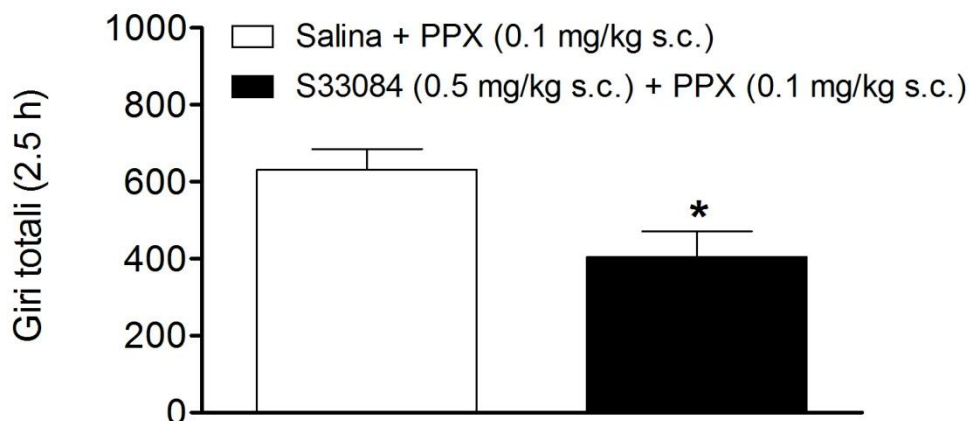


Figura 13. Effetto della somministrazione dell'antagonista dei recettori dopaminergici D₃ S33084 (0.5 mg/kg s.c.) sul turning controlaterale indotto dal PPX (0.1 mg/kg s.c.) in animali primed con apomorfina (0.5 mg/kg s.c.). L'S33084 è stato somministrato 5 min prima del PPX. Le colonne rappresentano la media \pm SEM del numero di rotazioni controlaterali effettuate dall'animale nelle 2.5 h successive alla somministrazione di PPX (* $p < 0.05$ vs controllo del corrispondente gruppo, *post hoc* test di Tukey).

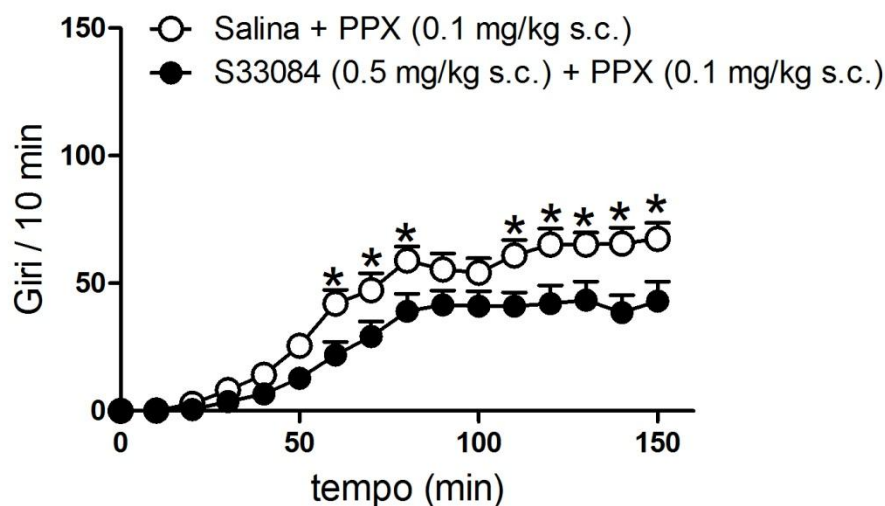


Figura 14. Effetto della somministrazione dell'antagonista dei recettori dopaminergici D₃ S33084 (0.5 mg/kg s.c.) sul turning controlaterale indotto da 0.1 mg/kg s.c. di PPX in animali primed con apomorfina (0.5 mg/kg s.c.). L'S33084 è stato somministrato 5 min prima del PPX. Le colonne rappresentano la media \pm SEM del numero di rotazioni controlaterali effettuate dall'animale nelle 2.5 h successive alla somministrazione di PPX, registrate ogni 10 min (* $p < 0.05$ vs controllo del corrispondente gruppo al *post hoc* test di Fisher LSD).

La figura 13, mostra il turning controlaterale indotto dalla somministrazione di PPX (0.1 mg/kg s.c.), da solo o in associazione all'antagonista dei recettori dopaminergici D₃,

S33084 (0.5 mg/kg s.c.). La somministrazione di S33084 (0.5 mg/kg s.c.) riduce significativamente il turning controlaterale totale indotto dal PPX (0.1 mg/kg s.c.). L'ANOVA a una via mostra un effetto del *pretrattamento* ($F_{1,16}=6.55$, $p<0.05$), evidenziato anche dall'analisi al *post-hoc* (test di Tukey) ($p<0.05$) (Figura 13). L'ANOVA a due vie della *time course* rivela un effetto del *pretrattamento* ($F_{1,16}=6.55$, $p<0.05$), del *tempo* ($F_{14,224}=78.83$, $p<0.05$) e dell'interazione *pretrattamento x tempo* ($F_{14,224}=3.11$, $p<0.05$). Il *post-hoc* (test di Fisher LSD) mette in evidenza differenze significative tra 60 e 80 min e tra 110 e 150 min ($p<0.05$) (Figura 14).

Ruolo della sensibilizzazione indotta dalla levodopa sul turning controlaterale indotto dal pramipexolo

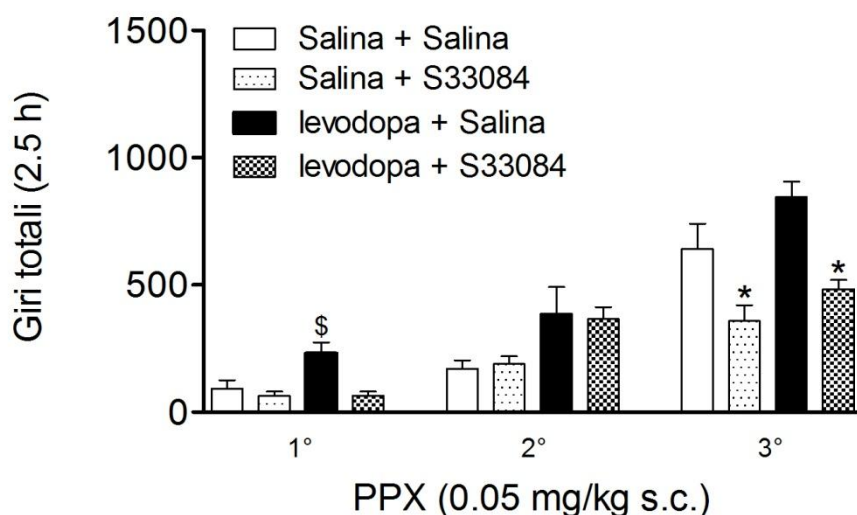


Figura 15. Effetto della somministrazione ripetuta di PPX (0.05mg/kg s.c.) da solo o in associazione all'antagonista dei recettori D_3 S33084 (0.5 mg/kg s.c.) in animali pretrattati con levodopa (6mg/kg s.c. + benserazide 6mg/kg s.c.) o salina. I valori sono espressi come media \pm SEM dei giri totali in 2.5 h (* $p<0.05$ vs controllo del corrispondente gruppo, ^{\$} $p<0.05$ vs pretrattati con salina, *post-hoc* test di Tukey).

La figura 15 mostra il turning controlaterale indotto da tre differenti esposizioni al PPX (0.05 mg/kg s.c.) da solo o in associazione all'antagonista dei recettori D_3 S33084 (0.5 mg/kg s.c.) in ratti sensibilizzati precedentemente alla levodopa e in ratti di controllo. In accordo con i risultati di Pinna *et al.* (2006), il trattamento cronico con levodopa induce un aumento progressivo del turning contro laterale (sensibilizzazione). Il turning totale, negli animali trattati con levodopa, nelle 2 h successive alla somministrazione, è pari a

250±30, 927±112, 1125±147, 1302±148 giri, rispettivamente nei giorni 1, 6, 12 e 18 del trattamento.

L'ANOVA a tre vie mette in evidenza un effetto del *pretrattamento* ($F_{1,30}=18.89$ $p<0.05$), del *trattamento* ($F_{1,30}=18.06$ $p<0.05$), del *tempo* ($F_{2,60}=70.65$ $p<0.05$) e un'interazione *tempo x trattamento* ($F_{2,60}=8.55$ $p<0.05$). Il *post-hoc* (test di Tukey) rivela che il turning controlaterale in risposta alla terza somministrazione di PPX in associazione all'S33084, sia nel gruppo pretrattato con salina che in quello pretrattato con levodopa, è significativamente inferiore rispetto ai corrispondenti gruppi sperimentali ($p<0.05$).

Inoltre, allo scopo di valutare l'esistenza di differenze significative nel gruppo pretrattato con levodopa e in quello di controllo, nell'ambito delle tre esposizioni al solo PPX, è stata effettuata l'ANOVA per singola esposizione, la quale ha messo in evidenza un effetto del *pretrattamento* ($F_{1,15}= 5.94$, $p<0.05$) nella prima esposizione, suffragata dal *post-hoc* (test di Tukey) ($p<0.05$).

Proprietà gratificanti del pramipexolo

Influenza del ceppo sull'espressione della preferenza spaziale condizionata indotta dal pramipexolo in ratti con lesione bilaterale dello striato dorsolaterale con 6-OHDA

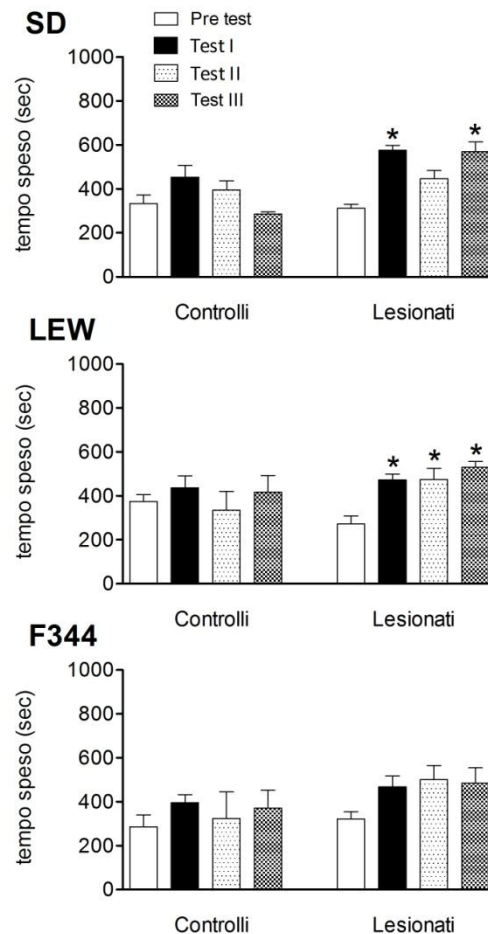


Figura 16. Preferenza spaziale condizionata indotta dalla somministrazione di PPX (1 mg/kg s.c.) in ratti Sprague Dawley (SD), Lewis (LEW) e Fischer 344 (F344), con lesione bilaterale dei terminali dopaminergici striatali dorso laterali e in ratti di controllo. Il PPX è stato somministrato 30 min prima e associato sempre al compartimento non preferito determinato il giorno del pre-test. Sono state effettuate quattro associazioni al farmaco. Le colonne rappresentano la media \pm SEM dei valori del tempo speso dall'animale nel compartimento associato al farmaco il giorno del test e quello trascorso nello stesso compartimento il giorno del test (* $p < 0.05$ vs pre-test corrispondente gruppo al *post hoc* test di Tukey).

La figura 16 mostra la preferenza spaziale condizionata indotta dalla somministrazione di PPX (1 mg/kg s.c.) in tre ceppi di ratti, Sprague Dawley (SD), Lewis (LEW) e Fischer 344 (F344) con lesione dopaminergica dello striato dorsolaterale. Il PPX induce una significativa preferenza spaziale condizionata nei ratti Sprague Dawley e Lewis, ma non nei Fischer 344, e nei controlli dei tre ceppi. L'ANOVA a tre vie rivela un

effetto della *lesione* ($F_{1,26}=6.87$, $p<0.05$), del *tempo* ($F_{3,78}=20.06$, $p<0.05$), dell'interazione *tempo x lesione* ($F_{3,78}=5.43$, $p<0.05$) e un'interazione *lesione x ceppo x tempo* ($F_{6,78}=2.29$, $p<0.05$).

Il *post-hoc* (test di Tukey) rivela che il PPX induce nei ratti Lewis una preferenza spaziale condizionata nei test I, II e III e nei ratti Sprague Dawley nei test I e III ($p<0.05$), ma non nei Fischer 344 ($p>0.05$) (Figura 16).

Pramipexolo e preferenza spaziale condizionata: ruolo della shell del nucleus accumbens

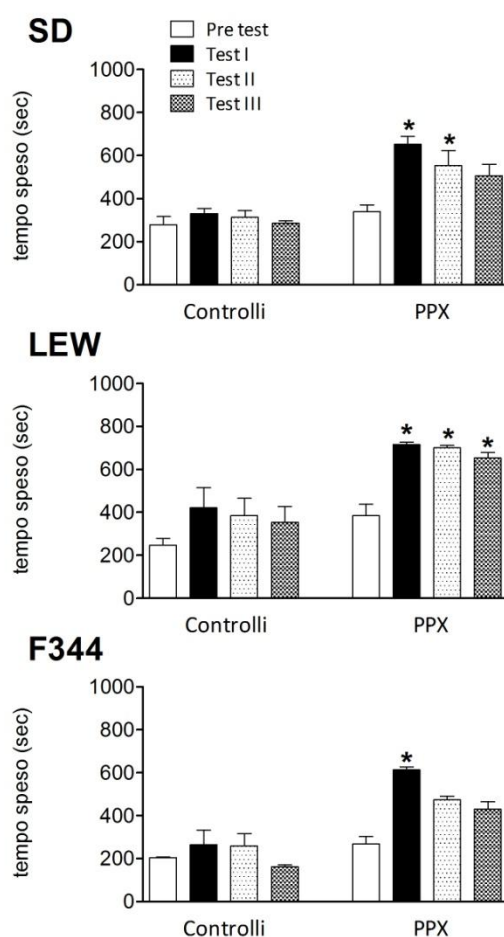


Figura 17. Preferenza spaziale condizionata indotta dall'infusione nella shell del nucleus accumbens di PPX (5 μ g/0.5 μ l per lato) o salina, in ratti Sprague Dawley (SD), Lewis (LEW) e Fischer 344 (F344). Il PPX è stato somministrato 30 min prima e associato sempre al compartimento non preferito determinato il giorno del pre-test. Sono state effettuate quattro associazioni al farmaco. Le colonne rappresentano la media \pm SEM dei valori del tempo speso dall'animale nel compartimento associato al farmaco nel pre-test e quello trascorso nello stesso compartimento nel test (* $p<0.05$ vs pre-test del corrispondente gruppo al *post hoc* test di Tukey).

L'infusione di PPX nella shell del nucleus accumbens, induce una preferenza spaziale significativa nei ratti Sprague Dawley (SD), Lewis (LEW) e Fischer 344 (F344) (Figura 17). L'ANOVA a tre vie mette in evidenza un effetto del *ceppo* ($F_{2,18}=9.41$, $p<0.05$), del *trattamento* ($F_{1,18}=72.56$, $p<0.05$), del *tempo* ($F_{3,54}=33.23$, $p<0.05$) e dell'interazione *trattamento x tempo* ($F_{3,54}=9.97$, $p<0.05$). Come si evince dalla figura 17, i ratti Lewis mostrano una persistenza della preferenza spaziale condizionata in tutti e tre i test effettuati ($p<0.05$ al *post-hoc* di Tukey), diversamente dagli Sprague Dawley (test I e II) e dai Fischer 344 (test I) ($p<0.05$ al *post-hoc* di Tukey).

Nella figura 18 è illustrata schematicamente, la ricostruzione della traccia della cannula nella shell del nucleus accumbens secondo l'atlante Paxinos e Watson (1998).

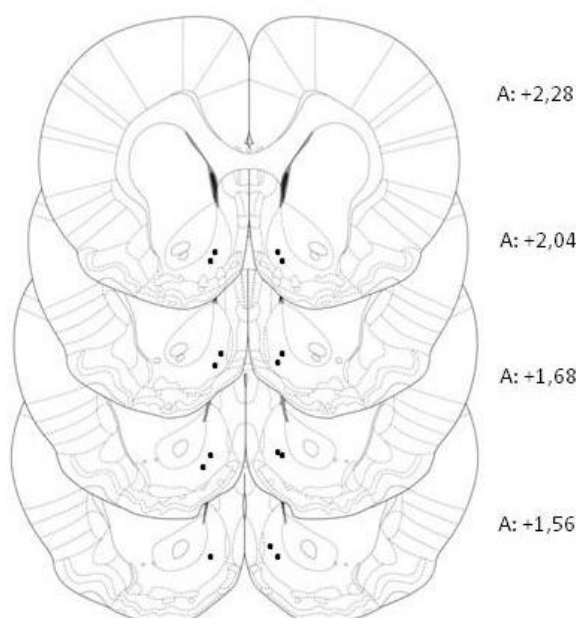


Figura 18. Rappresentazione schematica dei siti di infusione del PPX nella shell del nucleus accumbens. Il simbolo circolare rappresenta il punto in cui è stato infuso il farmaco, valutato dopo ricostruzione della traccia della cannula effettuata al microscopio ottico, in accordo con l'atlante Paxinos e Watson (1998). Sono rappresentate quattro differenti anteriorità rispetto al bregma (A= anteriorità).

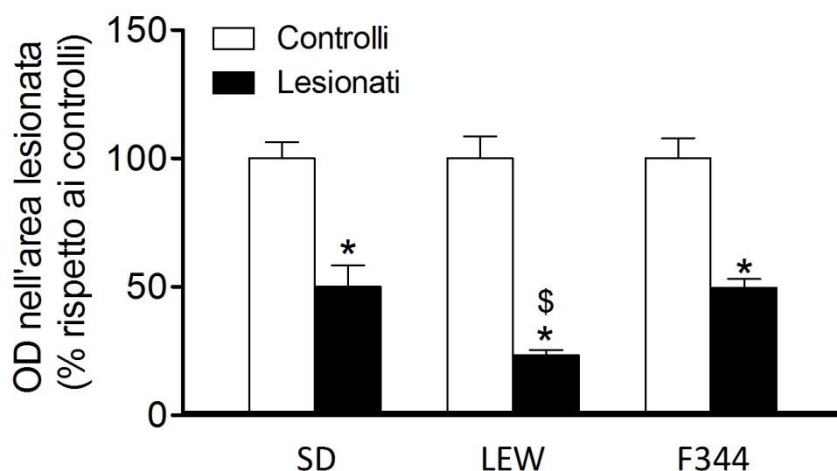


Figura 19. Immunoreattività della tirosina idrossilasi striatale dopo infusione di 6-OHDA ed espressa come variazione percentuale della densità ottica (OD) in ratti Sprague Dawley (SD), Lewis (LEW) e Fischer 344 (F344). I valori sono espressi come media \pm SEM delle percentuali della densità ottica nell'area lesionata (* $p < 0.05$ vs veicolo del corrispondente gruppo; $^{\$}p < 0.05$ vs gruppi Sprague Dawley e Fischer 344 lesionati, al *post hoc* test di Tukey).

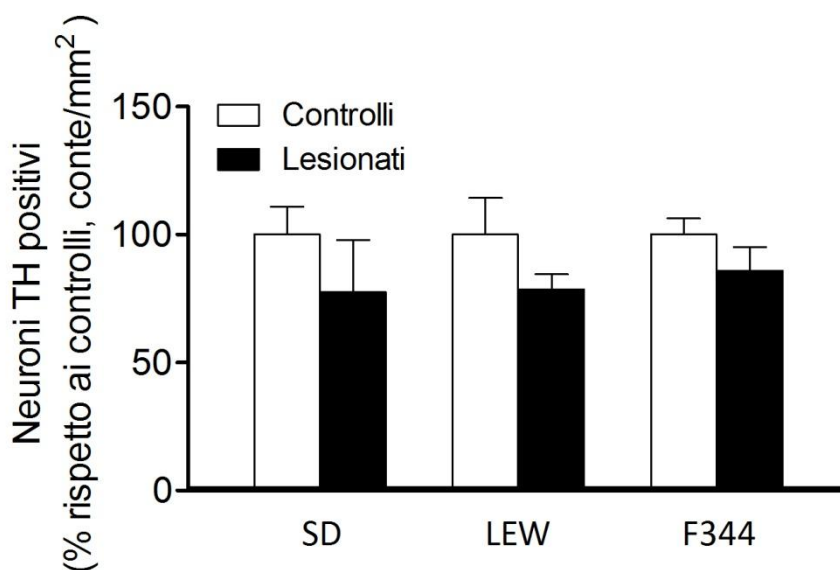


Figura 20. Immunoreattività alla tirosina idrossilasi (TH), misurata nella sostanza nera in ratti Sprague Dawley (SD), Lewis (LEW) e Fischer 344 (F344), dopo lesione dei terminali striatali dorso laterali con 6-OHDA ed espressa come media \pm SEM delle percentuali dei neuroni tirosina idrossilasi positivi espressi come conte per mm^2 dei neuroni tirosina idrossilasi positivi rispetto ai controlli.

L'effetto della lesione dorsolaterale dei terminali striatali dopaminergici con la 6-OHDA, è stato analizzato come variazione percentuale della densità ottica (OD) nell'area

lesa rispetto ai controlli (Figura 19). Nell'area interessata dalla lesione, l'immunoreattività per la tirosina idrossilasi (TH) è significativamente ridotta nei tre ceppi di ratti, e tale riduzione è maggiore nei ratti Lewis (LEW), rispetto ai ratti Sprague Dawley (SD) e Fischer 344 (F344). L'ANOVA a due vie mette in evidenza un effetto della *lesione* ($F_{1,23}=149.12, p<0.05$), del *ceppo* ($F_{1,23}=3.67, p<0.05$) ed dell'interazione *ceppo x lesione* ($F_{1,23}=3.67, p<0.05$) (Figura 19). L'analisi *post-hoc* (test di Tukey), rivela che l'immunoreattività alla tirosina idrossilasi è significativamente ridotta in tutti e tre i ceppi rispetto ai controlli ($p<0.05$), e che i ratti Lewis presentano una lesione significativamente maggiore rispetto ai ratti Sprague Dawley e Fischer 344 ($p<0.05$) (Figura 19).

L'infusione di 6-OHDA nello striato dorso laterale causa una riduzione non significativa della percentuale di neuroni tirosina idrossilasi positivi nella sostanza nera rispetto al gruppo di controllo. Questo risultato potrebbe essere una conseguenza della tipologia di lesione effettuata, la quale, essendo circoscritta allo striato dorso-laterale, non induce una riduzione significativa dei neuroni dopaminergici nella sostanza nera (Figura 20).

Effetti antiparkinsoniani del pramipexolo

I risultati di questo studio, mettono in evidenza che la somministrazione dell'agonista dei recettori dopaminergici D₂/D₃ PPX, in ratti lesi unilateralmente nel fascio mediale del mesencefalo e primed con apomorfina, induce un intenso turning controlaterale alla dose di 0.1 e 0.35 mg/kg s.c., mentre non è stato osservato nessun effetto alla dose di 0.035 mg/kg s.c., la più bassa utilizzata. I risultati sono in accordo con quelli di altri autori (Mierau e Schingnitz, 1992; Prikhojan *et al.*, 2000), anche se si discostano per i protocolli sperimentali utilizzati (Prikhojan *et al.*, studiano l'effetto del PPX in ratti con lesione della sostanza nera).

L'analisi dei dati rivela una curva dose-riposta non lineare, infatti il turning ottenuto dalla dose più alta di PPX (0.35 mg/kg s.c.), risulta essere significativamente inferiore a quello indotto dalla dose intermedia (0.1 mg/kg s.c.). Tale riduzione potrebbe essere correlabile alla comparsa di stereotipie comportamentali (movimenti abnormi involontari), che insorgono con elevata incidenza alla dose più alta, e che a causa della loro persistenza, interferiscono con l'espressione del turning controlaterale.

E' stato dimostrato che in animali sani, basse dosi di agonisti D₂/D₃ inducono una riduzione dell'attività locomotoria, mediante un meccanismo che coinvolgerebbe la stimolazione dei recettori D₂ preferenzialmente in sede presinaptica; mentre, alte dosi di agonisti, inducono attivazione locomotoria mediata dai recettori D₂ postsinaptici (Pugsley *et al.*, 1995; Pritchard *et al.*, 2003; Millan *et al.*, 2004). Infatti, contrariamente a quanto suggerito dagli studi iniziali, il quinpirolo, il 7-OH-DPAT, il quinolorano e lo stesso PPX, correntemente considerati come agonisti D₃ preferenziali, pur avendo una maggiore affinità per i recettori D₃ che per i D₂, tale differenza di affinità è insufficiente a compensare l'assoluta preponderanza dei recettori D₂, sia nello striato dorsale che in quello ventrale. Per quanto riguarda il ruolo dei recettori D₃ negli effetti inibitori esercitati dagli agonisti sul comportamento, bisogna considerare che studi elettrofisiologici (Mercuri *et al.*, 1997), mostrano che la delezione genica (knock-out) dei recettori D₂ dai neuroni dopaminergici, elimina del tutto gli effetti iperpolarizzanti esercitati dagli agonisti D₂/D₃ sui neuroni dopaminergici. Queste osservazioni escludono l'esistenza di autorecettori D₃ e attribuiscono interamente alla stimolazione di autorecettori D₂ gli effetti sedativi e inibitori sulla motilità degli agonisti D₂/D₃ come il quinpirolo, il 7-OH-DPAT, il quinolorano e lo

stesso PPX. D'altra parte, ad alte dosi, il PPX, a causa della supersensitività da denervazione indotta dalla lesione dei neuroni dopaminergici, induce un'attivazione locomotoria tale da indurre stereotipie comportamentali, che interferiscono con l'espressione del movimento rotatorio.

L'analisi del profilo farmacologico del PPX rivela che il blocco dei recettori dopaminergici D_1 , ottenuto dopo la somministrazione dell'antagonista selettivo, l'SCH 39166 (0.1 mg/kg s.c.), non influenza il turning indotto dalla dose intermedia di PPX utilizzata (0.1 mg/kg s.c.), ma potenzia quello ottenuto alla dose di 0.35 mg/kg s.c. Tale effetto potrebbe essere correlato da un lato, al blocco dei recettori D_1 esercitato sul lato sano, che si tradurrebbe sia in una riduzione dell'espressione delle stereotipie, che in un aumento della torsione controlaterale.

E' stato dimostrato che l'attivazione dei recettori D_3 all'interno del complesso eterodimerico D_1 - D_3 , porta ad un aumento dell'affinità degli agonisti D_1 per il proprio sito di legame. Questa interazione sembra essere unidirezionale in quanto la stimolazione D_1 non si è dimostrata in grado di indurre modificazioni nel binding dell'agonista D_3 R-(+)-7-OH-DPAT (Marcellino *et al.*, 2008). Per quanto riguarda le interazioni a livello biochimico, in seguito a stimolazione dei recettori D_3 è stata osservata sia una facilitazione, sia un'inibizione dei recettori D_1 , che potrebbe dipendere dalla peculiare localizzazione a livello striatale e dalla via di segnale coinvolta (Ridray *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 1998; Marcellino *et al.*, 2008; Fiorentini *et al.*, 2008). Tuttavia, non è ancora stato chiarito se i meccanismi alla base dell'effetto sinergico tra recettori D_1 e D_3 , si riflettano nell'espressione del comportamento (Marcellino *et al.*, 2008).

Pertanto, e a maggior ragione, vista l'incertezza sul ruolo dei recettori D_3 nel turning indotto nel modello di lesione unilaterale dei neuroni dopaminergici, è del tutto speculativa la possibilità che il potenziamento del turning controlaterale osservato dopo la somministrazione del PPX (0.35 mg/kg s.c.) in associazione con l'antagonista dei recettori dopaminergici D_1 , SCH 39166, sia il risultato di una azione dell'antagonista D_1 su eventuali eterodimeri D_1 - D_3 .

Un'interessante osservazione di questo studio è data dal fatto che il PPX non è in grado di indurre turning controlaterale in animali drug-naive. Infatti, la stimolazione dei recettori D_2 alle dose da noi testate, se pur molto alte, nei ratti drug-naive non è sufficiente per l'espressione del turning, il quale, alla prima esposizione richiede quindi una pre-esposizione ad un agonista D_1 / D_2 , cioè un priming.

Da questo punto di vista, le proprietà del PPX appaiono ben diverse da quelle della rotigotina (Parkinson Study Group, 2003; Guldenpfenning *et al.*, 2005; Jenner 2005; LeWitt, 2005; Scheller, 2006). Questo agonista, infatti, è attivo sui recettori D₁ a concentrazioni simili a quelle che attivano i recettori D₂ (Scheller, 2006) ed è in grado di indurre turning controlaterale nel modello di lesione unilaterale anche in ratti drug-naive (Fenu *et al.*, in preparazione).

I dati comportamentali basati sulle differenze tra PPX e rotigotina, sono confermati dall'osservazione che mentre la rotigotina, alle stesse dosi alle quali produce turning controlaterale, stimola l'espressione del gene precoce c-fos nello striato leso con 6-OHDA, il PPX è del tutto inattivo, sia in ratti primed che drug-naive (Fenu *et al.*, in preparazione).

I risultati del nostro studio suggeriscono che il turning indotto dal PPX è mediato dalla stimolazione sia D₂ che D₃. Infatti, sia gli antagonisti D₂ (eticlopride), che D₃ (S33084) riducono il turning indotto dal PPX. Bisogna tuttavia considerare che il ruolo dei recettori D₃ è evidentemente ben inferiore rispetto a quello dei recettori D₂; infatti, mentre l'antagonista D₂, l'eticlopride, blocca totalmente il turning da PPX, l'antagonista D₃ lo riduce in maniera limitata. Data la spiccata attività degli antagonisti D₂ nel bloccare il turning da PPX, non possiamo nemmeno escludere che l'effetto dell'antagonista D₃ sia dovuto ad una residua capacità di agire sui recettori D₂.

Alla luce dell'incertezza sulla reale importanza dei recettori D₃ nel turning controlaterale e negli effetti antiparkinsoniani del PPX, assume un valore puramente speculativo l'ipotesi che in questi effetti giochino un ruolo eventuali eterodimeri D₂-D₃ (Maggio e Millan, 2010). Infatti, nonostante sia stato dimostrato che il PPX possiede un'attività intrinseca espressa in percentuale di inibizione dell'adenilato ciclasi, sui recettori D₂ pari al 71.8% e sugli etero dimeri D₂-D₃ pari al 86.2%, e che i dimeri D₂-D₃ potrebbero inoltre possedere caratteristiche proprie D₂ o D₃ (Maggio e Millan, 2010), la bassa efficacia del blocco D₃ nel ridurre il turning controlaterale indotto dal PPX suggerisce che i recettori D₂ implicati nell'effetto dell'antagonista D₂, non siano dimerizzati con i recettori D₃.

Un'altra osservazione di questa tesi è che il PPX induce sensibilizzazione comportamentale. Infatti, il trattamento ripetuto con basse dosi di PPX (0.05 mg/kg s.c.), induce un turning controlaterale che tende progressivamente ad aumentare di intensità nel tempo. Inoltre, in animali sensibilizzati con levodopa, la risposta ad una bassa dose di PPX è significativamente aumentata rispetto ai controlli non sensibilizzati. Infatti, nella prima somministrazione di PPX, dopo sensibilizzazione con levodopa, il turning contro laterale è

maggiore nel gruppo pretrattato con levodopa rispetto al gruppo di controllo. Questo effetto potrebbe essere spiegato dalla capacità della levodopa di indurre un aumento dell'espressione dei recettori D₃ nel caudato-putamen (Bordet *et al.*, 2000; Guillin *et al.*, 2001; Bezard *et al.*, 2003).

Tuttavia, la somministrazione dell'antagonista dei recettori dopaminergici D₃ S33084 riduce significativamente il turning controlaterale indotto dalla terza esposizione al PPX, ma questo effetto si osserva in ugual misura nel gruppo pretrattato con levodopa e in quello di controllo. Pertanto, i nostri risultati non supportano l'ipotesi formulata da altri autori (Bordet *et al.*, 2000; Guillin *et al.*, 2001; Bezard *et al.*, 2003) secondo i quali la sensibilizzazione comportamentale indotta dalla levodopa sia dovuta ad una aumentata espressione di recettori D₃.

Proprietà gratificanti del pramipexolo

I risultati della seconda parte del nostro studio mettono in evidenza che, sia in ratti lesionati bilateralmente nello striato dorso-laterale con la 6-OHDA, sia in ratti sani, nei quali il farmaco è infuso direttamente nella shell del nucleus accumbens (NAc), il PPX possiede sufficienti proprietà gratificanti, da supportare l'acquisizione di una preferenza spaziale condizionata.

I risultati sono in accordo con quelli di studi precedenti, nei quali è stato dimostrato che agonisti D_2/D_3 come il 7-OH-DPAT, il PD-128907, il quinerolano (Chaperon e Thiébot, 1996; Hoffman *et al.*, 1988; Khroyan *et al.*, 1997; Mallet e Beninger, 1994), e il PPX stesso (Riddle *et al.*, 2012; Ouachikh *et al.*, 2013, 2014) sono in grado di indurre preferenza spaziale condizionata. Inoltre, le proprietà di rinforzo del PPX sono state dimostrate da Engeln *et al.* (2013), i quali hanno evidenziato che sia ratti sani, che con lesione parziale dei terminali dopaminergici, si auto-somministrano il PPX.

Allo stato attuale esistono anche studi contrastanti, i quali indicano che gli agonisti dei recettori D_2-D_3 possono indurre avversione o non essere in grado di indurre preferenza spaziale condizionata (Gyertyan e Gal, 2003, Khroyan *et al.*, 1995). Il contrasto di questi studi potrebbe essere dovuto alle differenze nelle procedure sperimentali, al grado di lesione, e nel caso della preferenza spaziale, al tempo di esposizione del farmaco. Infatti, come evidenziato nel nostro studio e in quello di Riddle *et al.* (2012), l'associazione del PPX all'ambiente si effettua almeno mezz'ora dopo la sua somministrazione, in quanto dopo somministrazione acuta, il PPX induce un evidente stato di ipomotilità, che potrebbe interferire con l'acquisizione del paradigma.

La lesione dei terminali striatali, la quale rappresenta un modello sperimentale con caratteristiche simili alla patologia umana allo stadio iniziale (Deumens *et al.*, 2002, Przedborski *et al.*, 1995), non solo non altera le proprietà gratificanti del PPX, ma potrebbe amplificarle; infatti, l'acquisizione della preferenza spaziale condizionata è una prerogativa del ratto lesionato, ma non del controllo. La lesione dello striato dorso laterale potrebbe rendere gli animali più sensibili e/o vulnerabili agli effetti gratificanti del PPX (Riddle *et al.*, 2012). In questo contesto è importante l'osservazione comportamentale, la quale fa emergere che i ratti lesionati, esprimono un comportamento di “*craving*” molto più intenso rispetto a quello esibito dagli animali di controllo. Il trattamento con PPX, se pur di breve durata, potrebbe aver sensibilizzato gli animali lesi, inducendo un aumento dei recettori D_2

e/o D₃ sia nello striato, che nel NAc shell, la cui stimolazione, potrebbe risultare nell'esaltazione delle proprietà di rinforzo del farmaco.

L'obiettivo del nostro studio era quello di valutare se la comparsa della sindrome da disregolazione dopaminergica nei pazienti in terapia con levodopa e/o agonisti dopaminergici, potesse essere correlata, da un lato, solo agli effetti intrinseci di rinforzo del PPX e al coinvolgimento della trasmissione dopaminergica mesolimbica, dall'altro anche al tipo di personalità, pazienti "*sensation seeking*", che nel nostro studio sono rappresentati dal ceppo di ratti Lewis, i quali possiedono un background fenotipico che li rende inclini alla dipendenza (Evans *et al.*, 2005, 2009; Voon *et al.*, 2009; Weintraub *et al.*, 2010) (vedere introduzione).

I risultati ottenuti, mettono in evidenza, che i ratti Lewis e Sprague Dawley, ma non i Fischer 344, con lesione dei terminali striatali dopaminergici, acquisiscono una significativa preferenza spaziale condizionata. L'importanza di questi risultati risiede nell'evidenza che i ratti Lewis, il ceppo incline alle dipendenze, esprimono una preferenza spaziale condizionata persistente nel tempo, di una magnitudo costante in tutti i test effettuati, mentre i ratti Sprague Dawley mostrano, in risposta al PPX, una certa variabilità, la quale potrebbe essere prerogativa del ceppo outbred, rappresentativo della popolazione generale.

Sulla base di queste evidenze, possiamo concludere che l'induzione della preferenza spaziale condizionata da parte del PPX, non è un fenomeno interamente influenzato dal background fenotipico, in quanto anche il ceppo outbred Sprague Dawley esprime significativa preferenza spaziale condizionata, al pari di quello inbred Lewis.

A parità di dose e di area cerebrale lesionata, il pattern di lesione ottenuto è differente nei tre ceppi di ratti. Esprimendo la lesione come percentuale della densità ottica degli animali lesionati rispetto ai controlli, i ratti del ceppo Lewis, presentano un grado di lesione maggiore rispetto ai ratti Sprague Dawley e Fischer 344. Questo potrebbe essere dovuto alla spiccata sensibilità del ceppo Lewis nei confronti dei processi infiammatori, a causa della loro minore responsività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e conseguentemente del rilascio di corticosterone (Sternberg *et al.*, 1989a, b; Wilder, 1993). Queste differenze potrebbero essere alla base della persistenza della preferenza spaziale condizionata nei ratti Lewis, la quale potrebbe essere correlata ad una maggiore sensibilizzazione al farmaco in questi animali, in risposta al grado di lesione maggiore. L'esistenza di una correlazione tra grado di lesione e manifestazione della preferenza spaziale condizionata è confermata dal fatto che, i ratti Fischer 344, che presentano un

grado di lesione inferiore, non acquisiscono una significativa preferenza. Questo, non ci permette di escludere che, a parità di grado di lesione, anche i ratti Fischer 344 possano esprimere una significativa preferenza spaziale condizionata. Tutti e tre i ceppi di ratti presentano un pattern di lesione dei neuroni dopaminergici nella sostanza nera di bassa entità, il quale potrebbe derivare, sia dalla tipologia di lesione effettuata, la quale essendo circoscritta nello striato dorso laterale, si presenta in maggior misura nella porzione laterale della sostanza nera, sia dai fenomeni compensatori che, a 4 settimane dalla lesione, potrebbero indurre fenomeni di parziale e/o totale recupero (Berghauzen-Maciejewska *et al.*, 2014).

La peculiare caratteristica della lesione parziale dello striato dorsolaterale, a differenza di quella del fascio mediale del mesencefalo, è quella di non coinvolgere la DA dello striato ventrale e in particolare della shell del NAc, che svolge, un ruolo fondamentale nell'acquisizione e nell'espressione della preferenza spaziale condizionata da farmaci d'abuso (Fenu *et al.*, 2006; Spina *et al.*, 2006).

Secondo Ouachikh *et al.* (2013), il PPX induce preferenza spaziale in ratti con lesionati con 6-OHDA nell'area ventrale del tegmento (VTA) posteriore ma non nei controlli. Questa lesione indurrebbe una supersensibilità da denervazione della shell rendendola più sensibile agli agonisti, la quale sensibilizzerebbe la shell via un incremento dei recettori D₂/D₃, rendendola più responsiva e facilitando l'acquisizione della preferenza spaziale condizionata indotta dal PPX (Ouachikh *et al.*, 2013). Al contrario, la lesione della VTA posteriore (da cui originano le fibre del sistema mesolimbico) ma non quella del VTA anteriore (da cui origina il sistema mesocorticale) abolisce la preferenza spaziale condizionata indotta dalla cocaina (Ouachikh *et al.*, 2013).

L'osservazione di questa tesi nella quale il PPX, quando infuso nel NAc, induce una preferenza senza differenze tra i ceppi di ratti utilizzati, conferma il coinvolgimento della shell del NAc nelle proprietà gratificanti del PPX. Nonostante la shell del NAc sia densamente popolata di recettori D₃ (Diaz *et al.*, 2000), il ruolo di questi recettori in questo paradigma è ancora da dimostrare. A differenza di quanto ottenuto dopo somministrazione sistemica del PPX negli animali con lesione striatale, il PPX, infuso nella shell del NAc, induce una preferenza spaziale condizionata anche nei ratti Fischer 344. Questa caratteristica potrebbe essere dovuta al fatto che il ceppo Fischer 344 è caratterizzato da una maggiore espressione di recettori dopaminergici D₃ nelle aree limbiche rispetto ai ratti Lewis, ma anche da una maggiore densità di recettori D₂ nello striato e nel core (Flores *et al.*, 1998). Si può ipotizzare che il ceppo di ratti Fischer 344 sia in grado di esprimere una

preferenza poiché la maggiore densità dei recettori D₂ e D₃ nella shell del NAc, potrebbe mediare l'espressione comportamentale degli effetti di rinforzo indotti dal PPX infuso direttamente in tale area.

Dall'analisi dei risultati ottenuti in questo studio, si può concludere che, alla base degli effetti gratificanti del PPX, il ceppo di ratti e quindi il fenotipo sembra giocare un ruolo, dato che a parità di acquisizione della preferenza spaziale condizionata nei diversi ceppi, soltanto i ratti Lewis, più inclini alle dipendenze, mostrano una resistenza all'estinzione.

Inoltre, si potrebbe assumere che, nonostante il differente pattern fenotipico tra i diversi ceppi, la preferenza spaziale condizionata, non sia in grado di far emergere differenze minime dell'espressione comportamentale dovute al trattamento con farmaci utilizzati nella terapia dopaminergica sostitutiva. In altre parole, la caratterizzazione della sindrome da disregolazione dopaminergica è molto complessa, e potrebbe coinvolgere meccanismi che, in modelli preclinici, non sono valutabili attraverso il paradigma della preferenza spaziale condizionata, che è un paradigma che possiamo definire del “tutto o nulla”. Pertanto, potrebbe essere necessaria, al fine di raggiungere lo scopo dello studio, la valutazione dell'espressione comportamentale in seguito alla somministrazione di PPX, mediante l'uso di altri task, tra i quali lo Iowa Gambling Task, il quale è riconosciuto come valido strumento per la valutazione delle scelte decisionali e dell'impulsività (Bechara *et al.*, 1994), del gioco d'azzardo in pazienti dipendenti da sostanze d'abuso (Brevers *et al.*, 2012b; Cavedini *et al.*, 2002b; Goudriaan *et al.*, 2005, 2006; Kertzman *et al.*, 2011; Lakey *et al.*, 2007; Linnet *et al.*, 2006, 2011; Lorains *et al.*, 2014; Petry, 2001b) e in pazienti affetti da Parkinson (Voon *et al.*, 2011; Dagher e Robbins, 2009).

La prospettiva futura di questa ricerca, sarà quella di studiare gli effetti del PPX, utilizzando le stesse condizioni sperimentali di questo studio (tipo di lesione e ceppo di ratti), ma mediante l'uso di test che permettano di evidenziare meglio determinate differenze comportamentali. Le risposte dei differenti ceppi di ratti allo Iowa Gambling Task, potranno chiarire se, il diverso fenotipo possa essere un fattore determinante nell'insorgenza delle alterazioni comportamentali che si osservano in clinica. Inoltre, al fine di studiare le alterazioni dei processi alla base delle scelte decisionali, coinvolte nella sindrome da disregolazione dopaminergica e nei comportamenti impulsivo-compulsivi, mediante l'utilizzo di tale task, potrà essere valutato l'effetto della somministrazione del PPX in modelli animali di malattia di Parkinson.

Bibliografia

- Aarsland D., Brønnick K., Alves G., Tysnes O.B., Pedersen K.F., Ehrt U., Larsen J.P.** The spectrum of neuropsychiatric symptoms in patients with early untreated Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009 Aug;80(8):928-30.
- Abib E., Duarte L.F., Pereira R.** Comparative bioavailability: Two pramipexole formulations in healthy volunteers after a single dose administration under fasting conditions. *J Bioequiv Availab* 2012; 4:56–59
- Achat-Mendes C., Grundt P., Cao J., Platt D.M., Newman A.H., Spealman R.D.** Dopamine D3 and D2 receptor mechanisms in the abuse-related behavioral effects of cocaine: studies with preferential antagonists in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Aug;334(2):556-65.
- Aloisi G., Silvano E., Rossi M., Millan M.J., Maggio R.** Differential induction of adenylyl cyclase supersensitivity by antiparkinson drugs acting as agonists at dopamine D1/D2/D3 receptors vs D2/D3 receptors only: parallel observations from co-transfected human and native cerebral receptors. *Neuropharmacology*. 2011 Feb-Mar; 60(2-3):439-45.
- American Psychiatric Association.** DSM-V: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fifth ed. 2013.
- Anderson K. G., Woolverton, W. L.** Effects of clomipramine on self-control choice in Lewis and Fischer 344 rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 2005; 80, 387–393.
- Andreoli M., Tessari M., Pilla M., Valerio E., Hagan J.J., Heidbreder C.A.** Selective antagonism at dopamine D3 receptors prevents nicotine-triggered relapse to nicotine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2003 Jul;28(7):1272-80. Epub 2003 Apr 16.
- Ashby C.R. Jr, Paul M., Gardner E.L., Heidbreder C.A., Hagan J.J.** Acute administration of the selective D3 receptor antagonist SB-277011A blocks the acquisition and expression of the conditioned place preference response to heroin in male rats. *Synapse*. 2003 Jun 1;48(3):154-6.
- Aubert I., Guigoni C., Håkansson K., Li Q., Dovero S., Barthe N., Bioulac B.H., Gross C.E., Fisone G., Bloch B., Bezard E.** Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol*. 2005 Jan;57(1):17-26.
- Aubert I., Guigoni C., Li Q., Dovero S., Bioulac B.H., Gross C.E., Crossman A.R., Bloch B., Bezard E.** Enhanced preproenkephalin-B-derived opioid transmission in striatum and subthalamic nucleus converges upon globus pallidus internalis in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Biol Psychiatry*. 2007 Apr1;61(7):836-44.
- Aujla H., Beninger R.J.** Intra-BLA or intra-NAc infusions of the dopamine D3 receptor partial agonist, BP 897, block intra-NAc amphetamine conditioned activity. *Behav Neurosci*. 2004 Dec; 118(6):1324-30.
- Bassareo V., Di Chiara G.** Differential influence of associative and non associative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci* 1997; 17:851-861.
- Beaulieu J. M., Del'guidice T., Sotnikova T. D., Lemasson M. and Gainetdinov R. R.** Beyond cAMP: the regulation of Akt and GSK3 by dopamine receptors. *Front. Mol. Neurosci*. 2011; 4, 38.
- Bechara A., Damasio A.R., Damasio H., Anderson S.W.** Insensitivity to future consequences following damage to human prefrontal cortex. *Cognition* 1994; 50 (1–3),7–15.
- Beitner-Johnson D., Guitart X., Nestler E.J.** Dopaminergic brain reward regions of Lewis and Fischer rats display different levels of tyrosine hydroxylase and other morphine- and cocaine-regulated phosphoproteins. *Brain Res*. 1991 Oct 4;561(1):147-50.
- Bennett J.P. Jr, Piercey M.F.** Pramipexole--a new dopamine agonist for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 1999 Feb 1;163(1):25-31.

- Berghauzen-Maciejewska K., Kuter K., Kolasiewicz W., Głowacka U., Dziubina A., Ossowska K., Wardas J.** Pramipexole but not imipramine or fluoxetine reverses the "depressive-like" behaviour in a rat model of preclinical stages of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 2014 Sep 1;271:343-53.
- Bezard E., Ferry S., Mach U., Stark H., Leriche L., Boraud T., Gross C., and Sokoloff P.** Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nat Med* 2003; 9:762–767.
- Boileau I., Payer D., Chugani B., Lobo D., Behzadi A., Rusjan P.M.** The D2/3 dopamine receptor in pathological gambling: a positron emission tomography study with [(11)C]-(+)-propyl-hexahydro-naphtho-oxazinand [(11)C] raclopride. *Addiction* 2013a;108, 953–963.
- Boileau I., Payer D., Chugani B., Lobo D., Houle S., Wilson A. A., Warsh J, Kish SJ, Zack M.** In vivo evidence for greater amphetamine-induced dopamine release in pathological gambling: a positron emission tomography study with[(11)C]-(+)-PHNO. *Mol. Psychiatry* 2013b;163.[Epub ahead of print].
- Bordet R., Ridray S., Carboni S., Diaz J., Sokoloff P., Schwartz J.C.** Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 1;94(7):3363-7.
- Bordet R., Ridray S., Schwartz J.C., and Sokoloff P.** Involvement of the direct striatonigral pathway in levodopa-induced sensitization in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Eur J Neurosci* 2000; 12:2117–2123.
- Bosboom J.L., Stoffers D., Wolters E.Ch.** Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2004 Oct;111(10-11):1303-15.
- Braak H., Bohl J.R., Müller C.M., Rüb U., de Vos R.A., Del Tredici K.** The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord* 2006; 21:2042–2051.
- Brevers D., Cleeremans A., Verbruggen F., Bechara A., Kornreich C., Verbanck P., Noël X.** Impulsive action but not impulsive choice determines problemgambling severity. *Plos ONE* 2012b; 7 (11), e50647.
- Brooks D.J.** Dopamine agonists: their role in the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 2000. 68: 685-689.
- Brusa L., Bassi A., Stefani A., Pierantozzi M., Peppe A., Caramia M.D., Boffa L., Ruggieri S., Stanzione P.** Pramipexole in comparison to 1-dopa: a neuropsychological study. *Journal of Neural Transmission* 2003; vol. 110, no. 4, pp. 373–380.
- Cadoni C., Di Chiara G.** Differences in dopamine responsiveness to drugs of abuse in the nucleus accumbens shell and core of Lewis and Fischer 344 rats. *J Neurochem.* 2007 Oct;103(2):487-99.
- Cadoni C., Simola N., Espa E., Fenu S., Di Chiara G.** Strain dependence of adolescent Cannabis influence on heroin reward and mesolimbic dopamine transmission in adult Lewis and Fischer 344 rats. *Addict Biol.* 2015 Jan;20(1):132-42.
- Caine S.B., Koob G.F.** Modulation of cocaine self-administration in the rat through D-3 dopamine receptors. *Science.* 1993 Jun 18;260(5115):1814-6.
- Caine S.B., Koob G.F., Parsons L.H., Everitt B.J., Schwartz J.C., Sokoloff P.** D3 receptor test in vitro predicts decreased cocaine self- administration in rats. *Neuroreport* 1997;8:2373–7.
- Calon F., Goulet M., Blanchet P.J., Martel J.C., Piercey M.F., Bédard P.J., Di Paolo T.** Levodopa or D2 agonist induced dyskinesia in MPTP monkeys: correlation with changes in dopamine and GABAA receptors in the striatopallidal complex. *Brain Res.* 1995 May 22; 680(1-2):43-52.

- Calon F., Birdi S., Rajput A.H., Hornykiewicz O., Bédard P.J., Di Paolo T.** Increase of preproenkephalin mRNA levels in the putamen of Parkinson disease patients with levodopa-induced dyskinesias. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002 Feb;61(2):186-96.
- Calon F., Morissette M., Rajput A.H., Hornykiewicz O., Bédard P.J., Di Paolo T.** Changes of GABA receptors and dopamine turnover in the postmortem brains of parkinsonians with levodopa-induced motor complications. *Mov Disord.* 2003a Mar; 18(3):241-53.
- Calon F., Rajput A.H., Hornykiewicz O., Bédard P.J., Di Paolo T.** Levodopa-induced motor complications are associated with alterations of glutamate receptors in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2003 b Dec; 14(3):404-16.
- Camp D.M., Browman K.E., Robinson T.E.** The effects of methamphetamine and cocaine on motor behavior and extracellular dopamine in the ventral striatum of Lewis versus Fischer 344 rats. *Brain Res.* 1994 Dec 30;668(1-2):180-93.
- Carey R.J.** Chronic L-dopa treatment in the unilateral 6-OHDA rat: evidence for behavioral sensitization and biochemical tolerance. *Brain Res.* 1991 Dec 24; 568(1-2):205-14.
- Carvey P.M., Pieri S., Ling Z.D.** Attenuation of levodopa-induced toxicity in mesencephalic cultures by pramipexole. *J Neural Transm.* 1997;104(2-3):209-28.
- Cassano P., Lattanzi L., Soldani F., Navari S., Battistini G., Gemignani A., Cassano G.B.** Pramipexole in treatment-resistant depression: an extended follow-up. *Depress Anxiety* 2004; 20:131-8.
- Castrioto A., Funkiewicz A., Debû B., Cools R., Lhommée E., Ardouin C., Fraix V., Chabardès S., Robbins T.W., Pollak P., Krack P.** Iowa gambling task impairment in Parkinson's disease can be normalized by reduction of dopaminergic medication after subthalamic stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015 Feb;86(2):186-90.
- Cavedini P., Riboldi G., Keller R.** Frontal lobe dysfunction in pathological gambling patients. *Biol. Psychiatry* 2002b; 51, 334–341.
- Cenci M.A.** Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends in Neurosciences* 2007; 30, 236–243.
- Cervo L., Burbassi S., Colovic M., Caccia S.** Selective antagonist at D3 receptors, but not non-selective partial agonists, influences the expression of cocaine-induced conditioned place preference in free-feeding rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005 Dec;82(4):727-34. Epub 2006 Jan 6.
- Chaperon F., Thiébot M.H.** Effects of dopaminergic D3-receptor-preferring ligands on the acquisition of place conditioning in rats. *Behavioural Pharmacology* 1996;7:105–9.
- Chase T.N., Oh J.D., Konitsiotis S.** Antiparkinsonian and antidyskinetic activity of drugs targeting central glutamatergic mechanisms. *Journal of Neurology* 2000; 247 (Suppl. 2), II36–II42.
- Chernoloz O., El Mansari M., Blier P.** Sustained administration of pramipexole modifies the spontaneous firing of dopamine, norepinephrine, and serotonin neurons in the rat brain. *Neuropsychopharmacology* 2009;34:651-61.
- Chernoloz O., El Mansari M., Blier P.** Long-term administration of the dopamine D3/2 receptor agonist pramipexole increases dopamine and serotonin neurotransmission in the male rat forebrain. *J Psychiatry Neurosci.* 2012 Feb;37(2):113-21.
- Chu W., Tu Z., McElveen E., Xu J., Taylor M., Luedtke R.R., Mach R.H.** Synthesis and in vitro binding of N-phenyl piperazine analogs as potential dopamine D3 receptor ligands. *Bioorg Med Chem.* 2005 Jan 3;13(1):77-87.
- Cilia R., Akpalu A., Sarfo F.S., Cham M., Amboni M., Cereda E., Fabbri M., Adjei P., Akassi J., Bonetti A., Pezzoli G.** The modern pre-levodopa era of Parkinson's disease: insights into motor complications from sub-Saharan Africa. *Brain.* 2014 Oct;137(Pt 10):2731-42.

- Clarke CE, Guttman M.** Dopamine agonist monotherapy in Parkinson's disease. *Lancet*. 2002 Nov 30;360(9347):1767-9.
- Collins G.T., Truong Y.N., Levant B., Chen J., Wang S., Woods J.H.** Behavioral sensitization to cocaine in rats: evidence for temporal differences in dopamine D3 and D2 receptor sensitivity. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011 Jun;215(4):609-20.
- Connolly BS, Lang AE.** Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*. 2014 Apr 23-30;311(16):1670-83.
- Corrigall W.A., Coen, K.M.** Selective dopamine antagonists reduce nicotine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991; 104,171–176.
- Constantinescu R.** Update on the use of pramipexole in the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008 Apr;4(2):337-52.
- Curran E. J., Watson S. J. Jr.** Dopamine receptor mRNA expression patterns by opioid peptide cells in the nucleus accumbens of the rat: a double in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 1995; 361, 57–76.
- Czernecki V., Schüpbach M., Yaici S., Lévy R., Bardinet E., Yelnik J., Dubois B., Agid Y.** Apathy following subthalamic stimulation in Parkinson disease: a dopamine responsive symptom. *Mov Disord*. 2008 May 15;23(7):964-9.
- Dagher A., Robbins T.W.** Personality, addiction, dopamine: insights from Parkinson's disease. *Neuron* 2009; 61:502-510.
- Davie C.A.** A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull*. 2008;86:109-27. doi:10.1093/bmb/ldn013. Epub 2008 Apr 8.
- de Lau L.M., Breteler M.M.** Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006 Jun;5(6):525-35.
- Decaria C. M., Begaz T., and Hollander E.** Serotonergic and noradrenergic function in pathological gambling. *CNS Spectrums* 1998; vol. 3, no. 6, pp. 38–45.
- Desai R.A., Desai M.M., Potenza M.N.** Gambling, health and age: data from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Psychol Addict Behav*. 2007 Dec;21(4):431-40
- Detke M.J., Rickels M., Lucki I.** Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995 Sep;121(1):66-72.
- Deumens R., Blokland A., Prickaerts J.** Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*. 2002 Jun; 175(2):303-17.
- Di Chiara G.** A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. 1998; *J Psychopharmacol*. 12: 54-67.
- Di Chiara G.** Dopamine in disturbances of food and drug motivated behavior: a case of homology? *Physiol BehavNeurology* 2002;175:303–17.
- Di Chiara G.** Dopamine in disturbances of food and drug motivated behavior: a case of homology? *Physiol Behav*. 2005; 86:9-10.
- Di Ciano P.** Drug seeking under a second-order schedule of reinforcement depends on dopamine D3 receptors in the basolateral amygdala. *Behav Neurosci*. 2008 Feb;122(1):129-39.
- Diaz J., Pilon C., Le Foll B., Gros C., Triller A., Schwartz J.C., Sokoloff P.** Dopamine D3receptorsexpressedby all mesencephalic dopamine neurons. *J. Neurosci*. 2000; 20, 8677–8684.
- Djamshidian A., Averbeck B.B., Lees A.J., O'Sullivan S.S.** Clinical aspects of impulsive compulsive behaviours in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2011 Nov 15;310(1-2):183-8.

- Dodd M.L., Klos K.J., Bower J.H., Geda Y.E., Josephs K.A., Ahlskog J.E.** Pathological gambling caused by drugs used to treat Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2005 Sep;62(9):1377-81.
- Dodds C.M., O'Neill B., Beaver J., Makwana A., Bani M., Merlo-Pich E., Fletcher P.C., Koch A., Bullmore E.T., Nathan P.J.** Effect of the dopamine D(3) receptor antagonist GSK598809 on brain responses to rewarding food images in overweight and obese binge eaters. *Appetite* 2012, 59, 27–33.
- Dorsey E.R., Constantinescu R., Thompson J.P., Biglan K.M., Holloway R.G., Kieburtz K., Marshall F.J., Ravina B.M., Schifitto G., Siderowf A., Tanner C.M.** Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology.* 2007 Jan 30;68(5):384-6.
- Drui G., Carnicella S., Carcenac C., Favier M., Bertrand A., Boulet S., Savasta M.** Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Mol Psychiatry.* 2014 Mar;19(3):358-67.
- Driver-Dunckley E., Samanta J., and Stacy M.** Pathological gambling associated with dopamine agonist therapy in Parkinson's disease. *Neurology* 2003, vol. 61, no. 3, pp. 422–423.
- Duty S., Brotchie J.M.** Enhancement of the behavioral response to apomorphine administration following repeated treatment in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat is temporally correlated with a rise in striatal preproenkephalin-B, but not preproenkephalin-A, gene expression. *Exp. Neurol.* 1997; 144, 423–432.
- EMA 2005.** Module, Scientific Discussion. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000133/WC500049949.pdf.
- Engeln M., Ahmed S.H., Vouillac C., Tison F., Bezard E., Fernagut P.O.** Reinforcing properties of Pramipexole in normal and parkinsonian rats. *Neurobiol Dis.* 2013 Jan;49:79-86.
- Evans A.H., Lees A.J.** Dopamine dysregulation syndrome in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 2004 Aug;17(4):393-8.
- Evans A.H., Lawrence A.D., Potts J., Appel S., Lees A.J.** Factors influencing susceptibility to compulsive dopaminergic drug use in Parkinson disease. *Neurology.* 2005 Nov 22;65(10):1570-4.
- Evans A.H., Pavese N., Lawrence A.D., Tai Y.F., Appel S., Doder M., Brooks D.J., Lees A.J., Piccini P.** Compulsive drug use linked to sensitized ventral striatal dopamine transmission. *Ann Neurol.* 2006 May;59(5):852-8.
- Evans A.H., Strafella A.P., Weintraub D., Stacy M.** Impulsive and compulsive behaviors in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2009 Aug 15;24(11):1561-70.
- Favier M., Duran T., Carcenac C., Drui G., Savasta M., Carnicella S.** Pramipexole reverses Parkinson's disease-related motivational deficits in rats. *Mov Disord.* 2014 Jun;29(7):912-20.
- Fenu S., Spina L., Rivas E., Longoni R., Di Chiara G.** Morphine-conditioned single-trial place preference: role of nucleus accumbens shell dopamine receptors in acquisition, but not expression. *Psychopharmacology (Berl).* 2006 Aug;187(2):143-53.
- Fenu S., Wardas J., Morelli M.** Impulse control disorders and dopamine dysregulation syndrome associated with dopamine agonist therapy in Parkinson's disease. *Behav Pharmacol.* 2009 Sep;20(5-6):363-79.
- Fernandez H.H., Chen J.J.** Monoamine oxidase-B inhibition in the treatment of Parkinson's disease. *Pharmacotherapy* 2007; 27: 174-185.
- Ferrara J. M. and Stacy M.** Impulse-control disorders in Parkinson's disease. *CNS Spectrums* 2008; vol. 13, no. 8, pp. 690–698.
- Ferré S, O'Connor WT, Fuxe K, Ungerstedt U.** The striopallidal neuron: a main locus for adenosine-dopamine interactions in the brain. *J Neurosci.* 1993 Dec;13(12):5402-6.

- Ferre S, O'Connor WT, Svenningsson P, Bjorklund L, Lindberg J, Tinner B, Stromberg I, Goldstein M, Ogren SO, Ungerstedt U, Fredholm BB, Fuxe K.** Dopamine D1 receptor-mediated facilitation of GABAergic neurotransmission in the rat strioentopenduncular pathway and its modulation by adenosine A1 receptor-mediated mechanisms. *Eur J Neurosci.* 1996 Jul;8(7):1545-53.
- Fiorentini C., Busi C., Gorruso E., Gotti C., Spano P., Missale C.** Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol Pharmacol.* 2008 Jul;74(1):59-69.
- Fitzmaurice A.G., Rhodes S.L., Cockburn M., Ritz B., Bronstein J.M.** Aldehyde dehydrogenase variation enhances effect of pesticides associated with Parkinson disease. *Neurology.* 2014 Feb 4;82(5):419-26.
- Flores G., Wood G.K., Barbeau D., Quirion R., Srivastava L.K.** Lewis and Fischer rats: a comparison of dopamine transporter and receptors levels. *Brain Res.* 1998 Dec 14;814(1-2):34-40.
- Frank M.J., Seeberger L.C., O'reilly R.C.** By carrot or by stick: cognitive reinforcement learning in parkinsonism. *Science.* 2004 Dec 10;306(5703):1940-3.
- Gál K., Gyertyán I.** Dopamine D3 as well as D2 receptor ligands attenuate the cue-induced cocaine-seeking in a relapse model in rats. *Drug Alcohol Depend.* 2006 Jan 4;81(1):63-70. Epub 2005 Jul 7.
- Gallagher D.A., O'Sullivan S.S., Evans A.H., Lees A.J., Schrag A.** Pathological gambling in Parkinson's disease: risk factors and differences from dopamine dysregulation. An analysis of published case series. *Mov Disord Sep. 15* 2007;22(12):1757–63.
- George F.R., Goldberg S.R.** Genetic approaches to the analysis of addiction processes. *Trends Pharmacol Sci.* 1989 Feb;10(2):78-83.
- Gerfen C.R., Young III W.S.** Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res.* 1988; 460, 161–167.
- Gerfen C.R., Engber T.M., Mahan L.C., Susel Z., Chase T.N., Monsma F.J. Jr, Sibley D.R.** D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.* 1990 Dec 7;250(4986):1429-32.
- Gerfen CR.** The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci.* 1992 Apr;15(4):133-9.
- Gilbert J.G., Newman A.H., Gardner E.L., Ashby C.R. Jr, Heidbreder C.A., Pak A.C., Peng X.Q., Xi Z.X.** Acute administration of SB-277011A, NGB 2904, or BP 897 inhibits cocaine cue-induced reinstatement of drug-seeking behavior in rats: role of dopamine D3 receptors. *Synapse.* 2005 Jul;57(1):17-28.
- Giovannoni G., O'Sullivan J.D., Turner K., Manson A.J., Lees A.J.** Hedonistic homeostatic dysregulation in patients with Parkinson's disease on dopamine replacement therapies. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2000;68:423–8.
- Goetz, C.G.** Dopaminergic agonists in the treatment of Parkinson's disease, *Neurology* 1990; 40 (Suppl. 3), 50.
- Goldberg J.F., Burdick K.E., Endick C.J.** Preliminary randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pramipexole added to mood stabilizers for treatment-resistant bipolar depression. *Am J Psychiatry* 2004;161:564-6.
- Goldman S.M., Kamel F., Ross G.W., Bhudhikanok G.S., Hoppin J.A., Korell M., Marras C., Meng C., Umbach D.M., Kasten M., Chade A.R., Comyns K., Richards M.B., Sandler D.P., Blair A., Langston J.W., Tanner C.M.** Genetic modification of the association of paraquat and Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012 Nov;27(13):1652-8.

- Goudriaan A.E., Oosterlaan J., de Beurs E., van den Brink W.** Decision making in pathological gambling: a comparison between pathological gamblers, alcohol dependents, persons with Tourette syndrome, and normal controls. *Cogn. Brain Res.* 2005; 23, 137–151.
- Goudriaan A.E., Oosterlaan J., de Beurs E., van den Brink W.** Psychophysiological determinants and concomitants of deficient decisionmaking in pathological gamblers. *Drug Alcohol Depend.* 2006, 84 (3), 231–239.
- Graff-Guerrero A., Redden L., Abi-Saab W., Katz D.A., Houle S., Barsoum P., Bhathena A., Palaparthi R., Saltarelli M.D., Kapur S.** Blockade of [¹¹C](+)-PHNO binding in human subjects by the dopamine D3 receptor antagonist ABT-925. *Int.J.Neuropsychopharmacol.* 2010; 13, 273–287.
- Graham W.C., Sambrook M.A., Crossman A.R.** Differential effect of chronic dopaminergic treatment on dopamine D1 and D2 receptors in the monkey brain in MPTP-induced parkinsonism. *Brain Res.* 1993 Feb 5; 602(2):290-303.
- Grundt P., Carlson E.E., Cao J., Bennett C.J., McElveen E., Taylor M., Luedtke R.R., Newman A.H.** Novel heterocyclic trans olefin analogues of N-{4-[4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl]butyl}arylcarboxamides as selective probes with high affinity for the dopamine D3 receptor. *J Med Chem.* 2005 Feb 10;48(3):839-48.
- Grundt P., Prevatt K.M., Cao J., Taylor M., Floresca C.Z., Choi J.K., Jenkins B.G., Luedtke R.R., Newman A.H.** Heterocyclic analogues of N-(4-(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)butyl)arylcarboxamides with functionalized linking chains as novel dopamine D3 receptor ligands: potential substance abuse therapeutic agents. *J Med Chem.* 2007 Aug 23; 50(17):4135-46.
- Gschwandtner U., Aston J., Renaud S., Fuhr P.** Pathologic gambling in patients with Parkinson's disease. *Clinical Neuropharmacology* 2001; vol. 24, no. 3, pp. 170–172.
- Güldenpfennig W.M., Poole K.H., Sommerville K.W., Boroojerdi B.** Safety, tolerability, and efficacy of continuous transdermal dopaminergic stimulation with rotigotine patch in early-stage idiopathic Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol.* 2005 May-Jun;28(3):106-10.
- Guigoni C., Aubert I., Li Q., Gurevich V.V., Benovic J.L., Ferry S., Mach U., Stark H., Leriche L., Håkansson K., Bioulac B.H., Gross C.E., Sokoloff P., Fisone G., Gurevich E.V., Bloch B., Bezard E.** Pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia: focus on D1 and D3 dopamine receptors. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005 Jun;11 Suppl 1:S25-9.
- Guillin O., Diaz J., Carroll P., Griffon N., Schwartz J.C., Sokoloff P.** BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature* 2001; 411:86–89.
- Gurevich E.V., Joyce J.N.** Distribution of dopamine D3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D2 receptor expressing neurons. *Neuropsychopharmacology.* 1999 Jan; 20(1):60-80.
- Gyertyan I., Gal K.** Dopamine D3 receptor ligands show place conditioning effect but do not influence cocaine-induced place preference. *Neuroreport* 2003;14:93–8.
- Hall E.D., Andrus P.K., Oostveen J.A., Althaus J.S., VonVoigtlander P.F.** Neuroprotective effects of the dopamine D2/D3 agonist pramipexole against postischemic or methamphetamine-induced degeneration of nigrostriatal neurons. *Brain Res.* 1996 Dec 2;742(1-2):80-8.
- Hamilton K.R., Potenza M.N., Grunberg N.E.** Lewis rats have greater response impulsivity than Fischer rats. *Addict Behav.* 2014 Nov;39(11):1565-72.
- Hayes D.J., Jupp B., Sawiak S.J., Merlo E., Caprioli D., Dalley J.W.** Brain γ -aminobutyric acid: a neglected role in impulsivity. *Eur J Neurosci.* 2014 Jun;39(11):1921-32.
- Heidbreder, C.A., Gardner, E.L., Xi, Z.X., Thanos, P.K., Mugnaini, M., Hagan, J. J., Ashby C.R. Jr.** The role of central dopamine D(3) receptors in drug addiction: a review of pharmacological evidence. *BrainRes.BrainRes.Rev.* 2005 49, 77–105.

Heidbreder C.A., Andreoli M., Marcon C., Hutcheson D.M., Gardner E.L., Ashby C.R. Jr. Evidence for the role of dopamine D3 receptors in oral operant alcohol self-administration and reinstatement of alcohol-seeking behavior in mice. *Addict.Biol.* 2007, 12, 35–50.

Henry B., Duty S., Fox S.H., Crossman A.R., Brotchie J.M. Increased striatal pre-proenkephalin B expression is associated with dyskinesia in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2003 Oct;183(2):458-68.

Higley A.E., Spiller K., Grundt P., Newman A.H., Kiefer S.W., Xi Z.X., Gardner E.L. PG01037, a novel dopamine D3 receptor antagonist, inhibits the effects of methamphetamine in rats. *J Psychopharmacol.* 2011 Feb;25(2):263-73.

Hoffman D.C., Dickson P.R., Beninger R.J. The dopamine D2 receptor agonists, quinpirole and bromocriptine produce conditioned place preferences. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 1988;12:315–22.

Holden C. Behavioral addictions debut in proposed DSM-V. *Science.* 2010;327(5968):935.

Holloway R.G., Shoulson I., Fahn S. Kieburtz K., Lang A., et al. Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease. A 4-year randomized controlled trial. *Arch Neurol* 2004;61:1044–1053.

Horstink M., Tolosa E., Bonuccelli U., Deuschl G., Friedman A., Kanovsky P., Larsen J.P., Lees A., Oertel W., Poewe W., Rascol O., Sampaio C. Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Movement Disorder Society-European Section. Part I: early (uncomplicated) Parkinson's disease. *European Journal of Neurology* 2006;13:1170–85.

Hsu A., Togasaki D.M., Bezard E., Sokoloff P., Langston J.W., Di Monte D.A., Quik M. Effect of the D3 dopamine receptor partial agonist BP897 [N-[4-(4-(2-methoxyphenyl)piperazinyl)butyl]-2-naphthamide] on L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesias and parkinsonism in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Nov;311(2):770-7.

Hubble J.P., Koller W.C., Cutler N.R., Sramek J.J., Friedman J., Goetz C, Ranhosky A., Korts D., Elvin A. Pramipexole in patients with early Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol.* 1995 Aug;18(4):338-47.

Hubble J.P. Pre-clinical studies of pramipexole: clinical relevance. *Eur J Neurol.* 2000 May;7 Suppl 1:15-20.

Hudson J. L., van Horne C. G., Stromberg I., Brock S., Clayton J., Masserano J., Hoffer B. J., Gerhardt G. A. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res.* 1993; 626: 167–174.

Hughes A.J., Daniel S.E., Blankson S., Lees A.J. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1993; 50:140–148.

Hyslop D.K., Hoffmann W.E., Smith M.W. and Piercey M.F. Excitation of anterior caudate neurons by stimulation of D3 receptors, *Neurosci. Abstr.* 1993; 19, 80.

Imamura A., Uitti R.J., Wszolek Z.K. Dopamine agonist therapy for Parkinson disease and pathological gambling. *Parkinsonism Relat Disord.* 2006 Dec;12(8):506-8.

Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008 Apr;79(4):368-76.

Jenner P. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. *Neurology* 2003;61(11 Suppl 6):S32–8.

Jenner P. A novel dopamine agonist for the transdermal treatment of Parkinson's disease. *Neurology.* 2005 Jul 26;65(2 Suppl 1):S3-5.

- Johnson P.S., Madden G.J., Brewer A.T., Pinkston J.W., Fowler S.C.** Effects of acute pramipexole on preference for gambling-like schedules of reinforcement in rats. *Psychopharmacology* 2011;231:11–8.
- Johanson K.A., Conn P.J., Niswender C.M.** Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's Disease. *CNS Neurological disorders drug targets* 2009; 8: 475–491.
- Joyce J.N.** Dopamine D3 receptor as a therapeutic target for antipsychotic and antiparkinsonian drugs. *Pharmacol Ther.* 2001 May-Jun;90(2-3):231-59.
- Joyce J.N., Millan M.J.** Dopamine D3 receptor antagonists as therapeutic agents. *Drug Discov Today.* 2005 Jul 1;10(13):917-25.
- Jupp B., Caprioli D., Saigal N., Reverte I., Shrestha S., Cumming P., Everitt B.J., Robbins T.W., Dalley J.W.** Dopaminergic and GABAergic markers of impulsivity in rats: evidence for anatomical localisation in ventral striatum and prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience* 2013; vol. 37, no. 9, pp. 1519–1528.
- Kalivas P.W., Stewart J.** Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev.* 1991 Sep-Dec; 16(3):223–44.
- Kapogiannis D., Mooshagian E., Campion P., Grafman J., Zimmermann T.J., Ladt K.C., Wassermann E.M.** Reward processing abnormalities in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2011; vol. 26, no. 8, pp. 1451–1457.
- Kelley A.E., Berridge K.C.** The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci.* 2002; 22(9):3306–11.
- Kertzman S., Lidogoster H., Aizer A., Kotler M., Dannon P.N.** Risk-taking decisions in pathological gamblers is not a result of their impaired inhibition ability. *Psychiatry Res.* 2011, 88 (1), 71–77.
- Khaled M.A., Farid Araki K., Li B., Coen K.M., Marinelli P.W., Varga J., Gaál J., Le Foll B.** The selective dopamine D3 receptor antagonist SB 277011-A, but not the partial agonist BP 897, blocks cue-induced reinstatement of nicotine-seeking. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010 Mar;13(2):181–90.
- Khaled M.A., Pushparaj A., Di Ciano P., Diaz J., Le Foll B.** Dopamine D(3) Receptors in the Basolateral Amygdala and the Lateral Habenula Modulate Cue-Induced Reinstatement of Nicotine Seeking. *Neuropsychopharmacology.* 2014 Jul 7.
- Khroyan T.V., Baker D.A., Neisewander J.L.** Dose-dependent effects of the D3- preferring agonist 7-OH-DPAT on motor behaviors and place conditioning. *Psychopharmacology* 1995;122:351–7.
- Khroyan T.V., Fuchs R.A., Baker D.A., Neisewander J.L.** Effects of D3-preferring agonists 7-OH-PIPAT and PD-128,907 on motor behaviors and place conditioning. *Behavioural Pharmacology* 1997;8:65–74.
- Kieburtz K., Shoulson I., McDermott M. et al.** Safety and efficacy of pramipexole in early Parkinson's disease. A randomized dose-ranging study. *JAMA* 1997, 278:125–130.
- Kirik D., Rosenblad C., Björklund A.** Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastratial 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol.* 1998 Aug;152(2):259–77.
- Kosten T.A., Miserendino M.J., Chi S., Nestler E.J.** Fischer and Lewis rat strains show differential cocaine effects in conditioned place preference and behavioral sensitization but not in locomotor activity or conditioned taste aversion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Apr;269(1):137–44.

- Lakey C.E., Goodie A.S., Campbell W.K.** Frequent card playing and pathological gambling: the utility of the Georgia Gambling Task and Iowa Gambling Task for predicting pathology. *J. Gambl. Stud.* 2007; 23, 285–297.
- Lawrence A.D., Evans A.H., Lees A.J.** Compulsive use of dopamine replacement therapy in Parkinson's disease: reward systems gone awry? *Lancet Neurol.* 2003 Oct;2(10):595-604.
- Le Foll B., Schwartz J.C., Sokoloff P.** Dopamine D3 receptor agents as potential new medications for drug addiction. *Eur Psychiatry.* 2000 Mar;15(2):140-6.
- Le Foll B., Francès H., Diaz J., Schwartz J.C., Sokoloff P.** Role of the dopamine D3 receptor in reactivity to cocaine-associated cues in mice. *Eur J Neurosci.* 2002 Jun;15(12):2016-26.
- Le Foll B., Diaz J., Sokoloff, P.** Neuroadaptations to hyperdopaminergic in dopamine D3 receptor-deficient mice. *LifeSci.* 2005a; 76, 1281–1296.
- Le Foll B., Sokoloff P., Stark H., Goldberg S .R.** Dopamine D3 receptor ligands block nicotine-induced conditioned place preferences through a mechanism that does not involve discriminative-stimulus or antidepressant-like effects. *Neuropsychopharmacology* 2005d; 30, 720–730.
- Le Foll B., Di Ciano P.** Neuronal circuitry underlying the impact of D3 receptor ligands in drug addiction. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014 Sep 16. pii: S0924-977X(14)00251-X.
- Le Moine C., Bloch B.** Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 1996; 73, 131– 143.
- Levy R., Dubois B.** Apathy and the functional anatomy of the prefrontal cortex-basal ganglia circuits. *Cereb Cortex.* 2006 Jul;16(7):916-28. Epub 2005 Oct 5.
- LeWitt P.** Rotigotine: a viewpoint by Peter LeWitt. *CNS Drugs.* 2005;19(11):983-4.
- Lieberman A., Ranhosky A., Korts D.** Clinical evaluation of pramipexole in advanced Parkinson's disease: results of a double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Neurology.* 1997 Jul;49(1):162-8.
- Linnet J., Røjskjær S., Nygaard Maher B.A.** Episodic chasing in pathological gamblers using the Iowa gambling task. *Scand. J. Psychol.* 2006, 47 (1), 43–49.
- Linnet J., Peterson E., Doudet D.J., Gjedde A., Møller A.** Dopamine release in ventral striatum of pathological gamblers losing money. *Acta Psychiatr. Scand.* 2010; 122, 326–333.
- Lorains F.K., Dowling N.A., Enticott P.G., Bradshaw J.L., Trueblood J.S., Stout J.C.** Strategic and non-strategic problem gamblers differ on decision making under risk and ambiguity. *Addiction*, 2014, 1–33.
- Madden G., Smith N., Brewer A., Pinkston J., Johnson P.** Steady-state assessment of impulsive choice in Lewis and Fischer 344 rats: Between-condition delay manipulations. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 2008; 90, 333–344.
- Madden G.J., Johnson P.S., Brewer A.T., Pinkston J.W., Fowler S.C.** Effects of pramipexole on impulsive choice in male Wistar rats. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 2010; 18:267–76.
- Maggio R., Millan M.J.** Dopamine D2-D3 receptor heteromers: pharmacological properties and therapeutic significance. *Curr Opin Pharmacol.* 2010 Feb; 10(1):100-7.
- Maj J., Rogóz Z., Skuza G., Kołodziejczyk K.** The behavioural effects of pramipexole, a novel dopamine receptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 1997 Apr 11;324(1):31-7.
- Mallet P.E., Beninger R.J.** 7-OH-DPAT produces place conditioning in rats. *European Journal of Pharmacology* 1994; 261:R5–6.
- Manning B. D., Cantley L.C.** AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007, 129, 1261–1274.

Marcellino D., Ferre S., Casado V., Cortes A., Le Foll B., Mazzola C., Drago F., Saur O., Stark H., Soriano A., Barnes C., Goldberg S.R., Lluís C., Fuxe K., Franco R. Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J Biol Chem* 2008; 283:26016–25.

Marconi R., Lefebvre-Caparro D., Bonnet A.M., Vidailhet M., Dubois B., Agid Y. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease phenomenology and pathophysiology. *Mov Disord.* 1994 Jan;9(1):2-12.

Marin R.S. Differential diagnosis and classification of apathy. *Am J Psychiatry.* 1990 Jan;147(1):22-30.

Mela F., Millan M.J., Brocco M., Morari M. The selective D(3) receptor antagonist, S33084, improves parkinsonian-like motor dysfunction but does not affect L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine hemi-lesioned rats. *Neuropharmacology.* 2010 Feb;58(2):528-36.

Mercuri N.B., Saiardi A., Bonci A., Picetti R., Calabresi P., Bernardi G., Borrelli E. Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience.* 1997 Jul; 79(2): 323-7.

Mierau J., Schingnitz G. Biochemical and pharmacological studies on pramipexole, a potent and selective dopamine D2 receptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 1992 May 14;215(2-3):161-70.

Mierau J., Schneider F.J., F.J. Ensinger F.J., Chio C.L., Lajiness M.E. and Huff R.M. Pramipexole binding and activation of cloned and expressed dopamine D2, D3 and D4 receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 1995, 290, 29.

Millan M. J., Gobert A., Newman-Tancredi A., Lejeune F., Cussac D., Rivet J.-M., Audinot V., Dubuffet T., Lavielle G. S33084, a novel, potent, selective, and competitive antagonist at dopamine D3- receptors: I. Receptorial, electrophysiological and neurochemical profile compared with GR218,231 and L741,626. *J Pharmacol Exp Ther* 2000a; 293, 1048– 1062.

Millan M.J., Dekeyne A., Rivet J.M., Dubuffet T., Lavielle G., Brocco M. S33084, a novel, potent, selective, and competitive antagonist at dopamine D(3)-receptors: II. Functional and behavioral profile compared with GR218,231 and L741,626. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000b Jun;293(3):1063-73.

Millan M.J., Seguin L., Gobert A., Cussac D., Brocco M. The role of dopamine D3 compared with D2 receptors in the control of locomotor activity: a combined behavioural and neurochemical analysis with novel, selective antagonists in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2004 Jul;174(3):341-57.

Millan M.J., Loiseau F., Dekeyne A., Gobert A., Flik G., Cremers T.I., Rivet J.M., Sicard D., Billiras R., Brocco M. S33138 (N-[4-[2-[(3aS,9bR)-8-cyano-1,3a,4,9b-tetrahydro[1]benzopyrano[3,4-c]pyrrol-2(3H)-yl)-ethyl]phenyl]-acetamide), a preferential dopamine D3 versus D2 receptor antagonist and potential antipsychotic agent: III. Actions in models of therapeutic activity and induction of side effects. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Mar;324(3):1212-26.

Miyasaki J.M., Martin W., Suchowersky O., Weiner W.J., Lang A.E. Practice parameter: initiation of treatment for Parkinson's disease: an evidence-based review: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2002;58:11–7.

Mugnaini M., Lavarone L., Cavallini P., Griffante C., Olios B., Savoia C., Beaver J., Rabiner E.A., Micheli F., Heidbreder C., Andorn A., Merlo Pich E., Bani M. Occupancy of brain dopamine d(3) receptors and drug craving: a translational approach. *Neuropsychopharmacology* 2013, 38, 302–312.

Nakanishi T., Kanazawa I., Iwata M., Goto I., Kowa H., Mannen T., Mizuno Y., Nishitani H., Ogawa N., Takahashi A., et al. Nation-wide collaborative study on the long-term effects of bromocriptine in the treatment of parkinsonian patients: analysis on the maintenance and the change of the original mode of treatment. *Eur Neurol.* 1992;32 Suppl 1:23-9.

- Nathan P.J., O'Neill B.V., Mogg K., Bradley B.P., Beaver J., Bani M., Merlo-Pich E, Fletcher PC, Swirski B, Koch A, Dodds CM, Bullmore ET.** The effects of the dopamine D(3) receptor antagonist GSK598809 on attentional bias to palatable food cues in overweight and obese subjects. *Int.J.Neuropsychopharmacol.* 2012; 15, 149–161.
- Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H.** Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res.* 2004 Aug;24(3):165-205.
- Nisenbaum L.K., Kitai S.T., Crowley W.R., Gerfen C.R.** Temporal dissociation between changes in striatal enkephalin and substance P messenger RNAs following striatal dopamine depletion. *Neuroscience.* 1994 Jun;60(4):927-37.
- Nissbrandt H., Ekman A., Eriksson E., Heilig M.** Dopamine D3 receptor antisense influences dopamine synthesis in rat brain. *Neuroreport.* 1995 Feb 15;6(3):573-6.
- O'Sullivan S.S., Evans A.H., Lees A.J.** Dopamine dysregulation syndrome: an overview of its epidemiology, mechanisms and management. *CNS Drugs* 2009;23:157–70.
- Obeso J.A., Rodriguez-Oroz M.C., Rodriguez M., Lanciego J.L., Artieda J., Gonzalo N., Olanow C.W.** Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2000; 23:S8–S19.
- Olanow C.W.** Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology.* 1990 Oct;40(10 Suppl 3):suppl 32-7; discussion 37-9.
- Orio L., Wee S., Newman A.H., Pulvirenti L., Koob G.F.** The dopamine D3 receptor partial agonist CJB090 and antagonist PG01037 decrease progressive ratio responding for methamphetamine in rats with extended-access. *Addict Biol.* 2010 Jul;15(3):312-23.
- Ouachikh O., Dieb W., Durif F., Hafidi A.** Differential behavioral reinforcement effects of dopamine receptor agonists in the rat with bilateral lesion of the posterior ventral tegmental area. *Behav Brain Res.* 2013 Sep 1; 252:24-31.
- Ouachikh O., Dieb W., Durif F., Hafidi A.** Anterior ventral tegmental area dopaminergic neurons are not involved in the motivational effects of bromocriptine, pramipexole and cocaine in drug-free rats. *Behav Brain Res.* 2014 Apr 1; 262:1-7.
- Pak A.C., Ashby C.R. Jr, Heidbreder C.A., Pilla M., Gilbert J., Xi Z.X., Gardner E.L.** The selective dopamine D3 receptor antagonist SB-277011A reduces nicotine-enhanced brain reward and nicotine-paired environmental cue functions. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2006 Oct;9(5):585-602. Epub 2006 Aug 31.
- Parkinson Study Group.** A controlled trial of rogitotine monotherapy in early Parkinson's disease. *Arch Neurol.* 2003 Dec;60(12):1721-8.
- Payer D.E., Behzadi A., Kish S.J., Houle S., Wilson A.A., Rusjan P.M., Tong J., Selby P., George T.P., McCluskey T., Boileau I.** Heightened D(3) dopamine receptor levels in cocaine dependence and contributions to the addiction behavioral phenotype: a positron emission tomography study with [(11)C]-(+)-PHNO. *Neuropsychopharmacology* 2014; 39, 311–318.
- Paxinos G., Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates. 1998 Sydney: Academic Press.
- Pellegrino L.J., Pellegrino A.S., Cushman A.J.** A stereotaxic atlas of the rat brain. 1979 New York: Plenum.
- Perachon S., Schwartz J.C., Sokoloff P.** Functional potencies of new antiparkinsonian drugs at recombinant human dopamine D1, D2 and D3 receptors. *Eur J Pharmacol.* 1999 Feb 5;366(2-3):293-300.
- Petry N.M.** Substance abuse, pathological gambling, and impulsiveness. *Drug Alcohol Depend.* 2001b; 63 (1), 29–38.

Petry N.M., Stinson F.S., Grant B.F. Comorbidity of DSM-IV pathological gambling and other psychiatric disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *J Clin Psychiatry*. 2005 May;66(5):564-74.

Picconi B., Pisani A., Barone I., Bonsi P., Centonze D., Bernardi G., Calabresi P. Pathological synaptic plasticity in the striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2005 Oct;26(5):779-83. Epub 2005 May 31.

Piercey, M.F., Hyslop D.K. and Hoffmann W.E. Excitation of type II candidate neurons by systemic administration of dopamine agonists, *Brain Res*. 1996; 706, 249.

Piercey M.F. Pharmacology of pramipexole, a dopamine D3-preferring agonist useful in treating Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*. 1998 May-Jun; 21(3):141-51.

Pinna A., Morelli M., Drukarch B., Stoof J.C. Priming of 6-hydroxydopamine-lesioned rats with L-DOPA or quinpirole results in an increase in dopamine D1 receptor-dependent cyclic AMP production in striatal tissue. *Eur J Pharmacol*. 1997 Jul 16;331(1):23-6.

Pinna A., Pontis S., Morelli M. Expression of dyskinetic movements and turning behaviour in subchronic L-DOPA 6-hydroxydopamine-treated rats is influenced by the testing environment. *Behav Brain Res*. 2006 Jul 15;171(1):175-8.

Pirritano D., Plastino M., Bosco D., Gallelli L., Siniscalchi A., De Sarro G. Gambling disorder during dopamine replacement treatment in Parkinson's disease: a comprehensive review. *Biomed Res Int*. 2014;2014:728038.

Pizzagalli D.A., Evins A.E., Schetter E.C., Frank M.J., Pajtas P.E., Santesso D.L., Culhane M. Single dose of a dopamine agonist impairs reinforcement learning in humans: behavioral evidence from a laboratory-based measure of reward responsiveness. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Feb; 196(2):221-32.

Pontieri F.E., Tanda G., Orzi F., Di Chiara G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 1996; 382:255-257.

Pontone G., Williams J. R., Bassett S. S., and Marsh L. Clinical features associated with impulse control disorders in Parkinson disease *Neurology* 2006; vol. 67, no. 7, pp. 1258–1261.

Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. 1978 Feb 15;47(4):379-91.

Prikhojan A., Brannan T., Yahr M.D. Comparative effects of repeated administration of dopamine agonists on circling behavior in rats. *J Neural Transm*. 2000;107(10):1159-64.

Pritchard L.M., Logue A.D., Hayes S., Welge J.A., Xu M., Zhang J., Berger S.P., Richtand N.M. 7-OH-DPAT and PD 128907 selectively activate the D3 dopamine receptor in a novel environment. *Neuropsychopharmacology*. 2003 Jan;28(1):100-7.

Przedborski S., Levivier M., Jiang H., Ferreira M., Jackson-Lewis V., Donaldson D., Togasaki D.M. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 1995;67:631–47.

Pugsley T.A., Davis M.D., Akunne H.C., MacKenzie R.G., Shih Y.H., Damsma G., Wikstrom H., Whetzel S.Z., Georgic L.M., Cooke L.W., et al. Neurochemical and functional characterization of the preferentially selective dopamine D3 agonist PD 128907. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995 Dec;275(3):1355-66.

Rabinak C.A., Nirenberg M.J. Dopamine agonist withdrawal syndrome in Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2010 Jan;67(1):58-63.

Rascol O. Dopamine agonists: what is the place of the newer compounds in the treatment of Parkinson's disease? *J Neural Transm Suppl*. 1999;55:33-45.

Reavill C., Taylor S.G., Wood M.D., Ashmeade T., Austin N.E., Avenell K.Y., Boyfield I., Branch C.L., Cilia J., Coldwell M.C., Hadley M.S., Hunter A.J., Jeffrey P., Jewitt F., Johnson

C.N., Jones D.N., Medhurst A.D., Middlemiss D.N., Nash D.J., Riley G.J., Routledge C., Stemp G., Thewlis K.M., Trail B., Vong A.K., Hagan J.J. Pharmacological actions of a novel, high-affinity, and selective human dopamine D(3) receptor antagonist, SB-277011-A. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Sep;294(3):1154-65.

Retz W., Rösler M., Supprian T., Retz-Junginger P., Thome J. Dopamine D3 receptor gene polymorphism and violent behavior: relation to impulsiveness and ADHD-related psychopathology. *J Neural Transm.* 2003 May;110(5):561-72.

Riba J., Kramer U.M., Heldmann M., Richter S., Munte T.F. Dopamine agonist increases risk taking but blunts reward-related brain activity. *PLoS ONE* 2008;3:e2479.

Riddle J.L., Rokosik S.L., Napier T.C. Pramipexole- and methamphetamine-induced reward-mediated behavior in a rodent model of Parkinson's disease and controls. *Behav Brain Res.* 2012 Jul 15;233(1):15-23.

Ridray S., Griffon N., Mignon V., Souil E., Carboni S., Diaz J., Schwartz J.C., Sokoloff P. Coexpression of dopamine D1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions. *Eur J Neurosci.* 1998 May;10(5):1676-86.

Robarge M.J., Husbands S.M., Kieltyka A., Brodbeck R., Thurkauf A. and Newman A.H. Design and synthesis of [(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl]alkylfluorenyl carboxamides as novel ligands selective for the dopamine D3 receptor subtype. *J. Med.Chem.* 2001; 44, 3175–3186.

Robinson T.E., Becker J.B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res.* 1986 Jun; 396(2):157-98.

Roy A., Adinoff B., Roehrich L., Lamparski D., Custer R., Lorenz V., Barbaccia M., Guidotti A., Costa E., Linnoila M. Pathological gambling. A psychobiological study. *Archives of General Psychiatry*; 1988 vol. 45, no. 4, pp. 369–373.

Ryan S.D., Dolatabadi N., Chan S.F., Zhang X., Akhtar M.W., Parker J., Soldner F., Sunico C.R., Nagar S., Talantova M., Lee B., Lopez K., Nutter A., Shan B., Molokanova E., Zhang Y., Han X., Nakamura T., Masliah E., Yates J.R. 3rd, Nakanishi N., Andreyev A.Y., Okamoto S., Jaenisch R., Ambasudhan R., Lipton S.A. Isogenic human iPSC Parkinson's model shows nitrosative stress-induced dysfunction in MEF2-PGC1 α transcription. *Cell.* 2013 Dec 5;155(6):1351-64.

Salles M.J., Hervé D., Rivet J.M., Longueville S., Millan M.J., Girault J.A., Mannoury la Cour C. Transient and rapid activation of Akt/GSK-3 β and mTORC1 signaling by D3 dopamine receptor stimulation in dorsal striatum and nucleus accumbens. *J Neurochem.* 2013 May; 125(4):532-44.

Samii A., Nutt J.G., Ransom B.R. Parkinson's disease. *Lancet* 2004 ; 363: 1783–1793.

Santangelo G., Vitale C., Trojano L., Verde F., Grossi D., Barone P. Cognitive dysfunctions and pathological gambling in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2009 Apr 30;24(6):899-905.

Santesso D.L., Evins A.E., Frank M.J., Schetter E.C., Bogdan R., Pizzagalli D.A. Single dose of a dopamine agonist impairs reinforcement learning in humans: evidence from event-related potentials and computational modeling of striatal-cortical function. *Hum Brain Mapp.* 2009 Jul;30(7):1963-76. Scarselli M, Novi F, Schallmach E, Lin R, Baragli A, Colzi A, et al. D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem* 2001;276:30308–14.

Scheller D., Chan P., Li Q., Wu T., Zhang R., Guan L., Ravenscroft P., Guigoni C., Crossman A.R., Hill M., Bezard E. Rotigotine treatment partially protects from MPTP toxicity in a progressive macaque model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2007 Feb;203(2):415-22. Epub 2006 Oct 12.

- Schmidt H.D., Anderson S.M., Pierce R.C.** Stimulation of D1-like or D2 dopamine receptors in the shell, but not the core, of the nucleus accumbens reinstates cocaine-seeking behaviour in the rat. *Eur J Neurosci.* 2006 Jan;23(1):219-28.
- Schmidt L., d'Arc B.F., Lafargue G., Galanaud D., Czernecki V., Grabli D., Schüpbach M., Hartmann A., Lévy R., Dubois B., Pessiglione M.** Disconnecting force from money: effects of basal ganglia damage on incentive motivation. *Brain.* 2008 May;131(Pt 5):1303-10.
- Schott B.H., Niehaus L., Wittmann B.C., Schütze H., Seidenbecher C.I., Heinze H.J., Düzel E.** Ageing and early-stage Parkinson's disease affect separable neural mechanisms of mesolimbic reward processing. *Brain.* 2007 Sep;130(Pt 9):2412-24.
- Schwartz J.C., Diaz J., Bordet R., Griffon N., Perachon S., Pilon C., Ridray S., Sokoloff P.** Functional implications of multiple dopamine receptor subtypes: the D1/D3 receptor coexistence. *Brain Res Rev* 1998; 26:236–242.
- Seedat S., Kesler S., Niehaus D. J. H., and Stein D. J.** Pathological gambling behaviour: emergence secondary to treatment of Parkinson's disease with dopaminergic agents. *Depression and Anxiety* 2000; vol. 11, no. 4, pp. 185–156.
- Shaffer H.J.** Strange bedfellows: a critical view of pathological gambling and addiction. *Addiction.* 1999 Oct;94(10):1445-8.
- Shannon K.M., Bennett J.P. Jr, Friedman J.H.** Efficacy of pramipexole, a novel dopamine agonist, as monotherapy in mild to moderate Parkinson's disease. The Pramipexole Study Group. *Neurology.* 1997 Sep;49(3):724-8. Erratum in: *Neurology* 1998 Mar;50(3):838.
- Silindir M., Ozer AY.** The benefits of pramipexole selection in the treatment of Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 2014 Oct;35(10):1505-11.
- Silverdale M.A., Nicholson S.L., Ravenscroft P., Crossman A.R., Millan M.J., Brochie J.M.** Selective blockade of D(3) dopamine receptors enhances the antiparkinsonian properties of ropinirole and levodopa in the MPTP-lesioned primate. *Exp Neurol* 2004;188:128–38.
- Siuciak J.A., Fujiwara R.A.** The activity of pramipexole in the mouse forced swim test is mediated by D2 rather than D3 receptors. *Psychopharmacology (Berl).* 2004 Sep;175(2):163-9.
- Sokoloff P., Giros B., Martres M.P., Bouthenet M.L., Schwartz J.C.** Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature.* 1990 Sep 13;347(6289):146-51.
- Sokoloff P., Diaz J., Le Foll B., Guillin O., Leriche L., Bezard E., Gross C.** The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006, 5:25-43.
- Song,R.,Yang,R.F.,Wu,N.,Su,R.B.,Li,J.,Peng,X.Q.** YQA14:a novel dopamine D3 receptor antagonist that inhibits cocaine self-administration in rats and mice, but not in D3 receptor-knock out mice. *Addict.Biol.* 2012; 17, 259–273.
- Spiller K., Xi Z.X., Peng X.Q., Newman A.H., Ashby C.R. Jr, Heidbreder C., Gaál J., Gardner E.L.** The selective dopamine D3 receptor antagonists SB-277011A and NGB 2904 and the putative partial D3 receptor agonist BP-897 attenuate methamphetamine-enhanced brain stimulation reward in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2008 Mar;196(4):533-42.
- Spina L., Fenu S., Longoni R., Rivas E., Di Chiara G.** Nicotine-conditioned single-trial place preference: selective role of nucleus accumbens shell dopamine D1 receptors in acquisition. *Psychopharmacology (Berl).* 2006 Mar;184(3-4):447-55.
- Sporn J., Ghaemi S.N., Sambur M.R., Rankin MA, Recht J, Sachs GS, Rosenbaum JF, Fava M.** Pramipexole augmentation in the treatment of unipolar and bipolar depression: a retrospective chart review. *Ann Clin Psychiatry* 2000;12:137-40.

- Stanwood G. D., Artymyshyn R. P., Kung M. P., Kung H. F., Lucki I., McGonigle P.** Quantitative autoradiographic mapping of rat brain dopamine D3 binding with [125I]7-OH-PIPAT: evidence for the presence of D3 receptors on dopaminergic and nondopaminergic cell bodies and terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 2000a; 295, 1223– 1231.
- Starkstein S.E., Leentjens A.F.** The nosological position of apathy in clinical practice. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008 Oct;79(10):1088-92.
- Stern M.B.** Head trauma as a risk factor for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1991;6(2):95-7.
- Sternberg E.M., Young W.S. 3rd, Bernardini R., Calogero A.E., Chrousos G.P., Gold P.W., Wilder R.L.** A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989a Jun; 86(12):4771-5.
- Sternberg E.M., Hill J.M., Chrousos G.P., Kamilaris T., Listwak S.J., Gold P.W., Wilder R.L.** Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989b Apr;86(7):2374-8.
- Suzuki T., George F.R., Meisch R.A.** Differential establishment and maintenance of oral ethanol reinforced behavior in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988a Apr;245(1):164-70.
- Suzuki T., Otani K., Koike Y., Misawa M.** Genetic differences in preferences for morphine and codeine in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. *Jpn J Pharmacol*. 1988b Aug;47(4):425-31. PubMed PMID: 3263529.
- Swarzenski B.C., O'Malley K.L., Todd R.D.** PTX-sensitive regulation of neurite outgrowth by the dopamine D3 receptor. *Neuroreport*. 1996 Jan 31;7(2):573-6.
- Sweetman S.C.** Pramipexole hydrochloride. Martindale, 36th edn.2009; Pharmaceutical Press, London, p 814.
- Tanner C.M., Goetz C.G., Glantz R.H., Klawans H.L.** Pergolide mesylate: four years experience in Parkinson's disease. *Adv Neurol*. 1987;45:547-9.
- Teychenne P.F., Leigh P.N., Reid J.L., Calne D.B., Greenacre J.K., Petrie A., Bamji A.N.** Idiopathic parkinsonism treated with bromocriptine. *Lancet*. 1975 Sep 13; 2(7933):473-6.
- Thanos P.K., Michaelides M., Ho C.W., Wang G.J., Newman A.H., Heidbreder C.A., Ashby C.R. Jr, Gardner E.L., Volkow N.D.** The effects of two highly selective dopamine D3 receptor antagonists (SB-277011A and NGB-2904) on food self-administration in a rodent model of obesity. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008 Jun;89(4):499-507.
- Thobois S., Ardouin C., Lhommée E., Klinger H., Lagrange C., Xie J., Fraix V., Coelho Braga M.C., Hassani R., Kistner A., Juphard A., Seigneuret E., Chabardes S., Mertens P., Polo G., Reilhac A., Costes N., LeBars D., Savasta M., Tremblay L., Quesada J.L., Bosson J.L., Benabid A.L., Broussolle E., Pollak P., Krack P.** Non-motor dopamine withdrawal syndrome after surgery for Parkinson's disease: predictors and underlying mesolimbic denervation. *Brain*. 2010 Apr;133(Pt 4):1111-27.
- Topf JL, Yip SW, Potenza MN.** Pathological Gambling: Biological and Clinical Considerations. *J Addict Med*. 2009 Sep 1;3(3):111-119.
- Tzschentke T.M.** Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol*. 2007 Sep;12(3-4):227-462.
- van Gaalen M., van Koten R., Schoffelemeer A., Vanderschuren, L.** Critical involvement of dopamine neurotransmission in impulsive decision making. *Biological Psychiatry* 2006a, 60, 66– 73.

- van Gaalen M., Brueggeman R., Bronius P., Schoffemeer A., Vanderschuren, L.** Behavioral disinhibition requires dopamine receptor activation. *Psychopharmacology* 2006b, 187, 73–85.
- Visanji N.P., Fox S.H., Johnston T., Reyes G., Millan M.J., Brotchie J.M.** Dopamine D3 receptor stimulation underlies the development of L-DOPA-induced dyskinesia in animal models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2009 Aug;35(2):184-92.
- Voon V., Hassan K., Zurowski M., de Souza M., Thomsen T., Fox S., Lang A.E., Miyasaki J.** Prevalence of repetitive and reward-seeking behaviors in Parkinson disease *Neurology*, 2006a, vol. 67, no. 7, pp. 1254–1257.
- Voon V., Hassan K., Zurowski M., Duff-Canning S., de Souza M., Fox S., Lang A.E., Miyasaki J.** Prospective prevalence of pathologic gambling and medication association in Parkinson disease. *Neurology*, 2006b, vol. 66, no. 11, pp. 1750–1752.
- Voon V., Thomsen T., Miyasaki J. M., de Souza M., Shafro A., Fox S.H., Duff-Canning S., Lang A.E., Zurowski M.** Factors associated with dopaminergic drug-related pathological gambling in Parkinson disease. *Archives of Neurology* 2007; vol. 64,no. 2, pp. 212–216.
- Voon V., Fox S. H.** Medication-related impulse control and repetitive behaviors in Parkinson disease. *Archives of Neurology* 2007; vol. 64, no. 8, pp. 1089–1096
- Voon V., Fernagut P.O., Wickens J., Baunez C., Rodriguez M., Pavon N., Juncos J.L., Obeso J.A., Bezard E.** Chronic dopaminergic stimulation in Parkinson's disease: from dyskinesias to impulse control disorders. *Lancet Neurol.* 2009 Dec;8(12):1140-9.
- Voon V., Sohr M., Lang A.E., Potenza M.N., Siderowf A.D., Whetteckey J., Weintraub D., Wunderlich GR, Stacy M.** Impulse control disorders in Parkinson disease: a multicenter case–control study. *Ann Neurol* 2011; 69:986-996.
- Voorn P., Roest G., Groenewegen H.J.** Increase of enkephalin and decrease of substance P immunoreactivity in the dorsal and ventral striatum of the rat after midbrain 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res.* 1987 Jun 2;412(2):391-6.
- Vorel S.R., Ashby C.R. Jr, Paul M., Liu X., Hayes R., Hagan J.J., Middlemiss D.N., Stemp G., Gardner E.L.** Dopamine D3 receptor antagonism inhibits cocaine-seeking and cocaine-enhanced brain reward in rats. *J Neurosci.* 2002 Nov 1;22(21):9595-603.
- Watts V.J., Neve K.A.** Sensitization of adenylate cyclase by Galpha i/o-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 2005; 106:405–21.
- Weber B., Schlicker E., Sokoloff P., Stark H.** Identification of the dopamine autoreceptor in the guinea-pig retina as D(2)receptor using novel subtype-selective antagonists. *Br.J.Pharmacol.* 2001; 133, 1243–1248.
- Weinshenker D.and Schroeder J. P.** There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction. *Neuropsychopharmacology* 2007; vol. 32, no. 7, pp. 1433–1451.
- Weintraub D., Siderowf A.D., Potenza M.N., Goveas J., Morales K.H., Duda J.E., Moberg P.J., Stern M.B.** Association of dopamine agonist use with impulse control disorders in Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2006 Jul;63(7):969-73.
- Weintraub D., Koester J., Potenza M.N., Siderowf A.D., Stacy M., Voon V., Whetteckey J., Wunderlich G.R., Lang A.E.** Impulse control disorders in Parkinson disease: a cross-sectional study of 3090 patients. *Archives of Neurology* 2010;67:589–95.
- Weiss H.D., Marsh L.** Impulse control disorders and compulsive behaviors associated with dopaminergic therapies in Parkinson disease. *Neurol Clin Pract.* 2012 Dec;2(4):267-274.
- Westin J.E., Andersson M., Lundblad M., Cenci M.A.** Persistent changes in striatal gene expression induced by long-term L-DOPA treatment in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 2001 Oct; 14(7):1171-6. Wise, R.A., 2004. Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 483e494.

Wilder R.L. Corticotropin releasing hormone and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the regulation of inflammatory arthritis. *Agents Actions Suppl.* 1993; 41:3-9.

Wise R.A., Spindler J., de Wit H., Gerberg G.J. Neuroleptic-induced "anhedonia" in rats: pimozone blocks reward quality of food. *Science* 1987; 201, 262– 264.

Wolters ECh., van der Werf Y.D., van den Heuvel O.A. Parkinson's disease-related disorders in the impulsive-compulsive spectrum. *J Neurol.* 2008 Sep;255 Suppl 5:48-56.

Wright C.E., Sisson T.L., Ichhpurani A.K., Peters G.R. Steady-state pharmacokinetic properties of pramipexole in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 1997 Jun;37(6):520-5.

Wynalda M.A., Wienkers L.C. Assessment of potential interactions between dopamine receptor agonists and various human cytochrome P450 enzymes using a simple in vitro inhibition screen. *Drug Metab Dispos.* 1997 Oct;25(10):1211-4.

Yahr, M.D. Parkinson's disease: new approaches to diagnosis and treatment, *Neurol. Scand.* 1993; 87 (Suppl. 146), 22.

Yamada K., Nagashima M., Kimura H., Matsumoto S., Furukawa T. Possible involvement of differing classes of dopamine D-2 receptors in yawning and stereotypy in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1990;100(2):141-4.

Yuan J., Chen X., Brodbeck R., Primus R., Braun J., Wasley J.W., Thurkauf A. NGB 2904 and NGB2849: two highly selective dopamine D3 receptor antagonists. *Bioorg. Med.Chem.Lett.* 1998; 8, 2715–2718.

Zapata A., Shippenberg T.S. D(3) receptor ligands modulate extracellular dopamine clearance in the nucleus accumbens. *J Neurochem.* 2002 Jun;81(5):1035-42.

Zapata A., Shippenberg T.S. Lack of functional D2 receptors prevents the effects of the D3-preferring agonist (+)-PD 128907 on dialysate dopamine levels. *Neuropharmacology.* 2005 Jan;48(1):43-50.

Zengin-Toktas Y., Authier N., Denizot H., Chassain C., Hafidi A., Llorca P.M., Durif F. Motivational properties of D2 and D3 dopamine receptors agonists and cocaine, but not with D1 dopamine receptors agonist and L-dopa, in bilateral 6-OHDA-lesioned rat. *Neuropharmacology.* 2013 Jul;70:74-82. 2

Siti internet consultati: www.epda.eu.com, www.epicentro.iss.it, www.pdf.org, www.treccani.it

Ringraziamenti

Ringrazio il *Prof. Gaetano Di Chiara* per avermi dato l'opportunità di frequentare la Scuola di Dottorato in Tossicologia, e per gli utili consigli che ho ricevuto in questi anni.

Desidero ringraziare calorosamente il *Dott. Sandro Fenu* per i preziosi insegnamenti che ha saputo sempre darmi in questi anni, rendendo questa esperienza altamente formativa, professionale e in grado di regalarmi numerose soddisfazioni dal punto di vista lavorativo, facendomi sentire sempre in un ambiente familiare.

Un ringraziamento particolare va alla *Dott.ssa Cristina Cadoni*, la quale è stata maestra di tanti insegnamenti.

Allo stesso modo ringrazio la *Dott.ssa Augusta Pisanu*, che ha saputo regalarmi un'infinità di conoscenze e di supporto.

Desidero inoltre ringraziare il *Dott. Daniele Lecca*, il quale con i suoi consigli, ha saputo fornirmi sempre preziose informazioni, la *Dott.ssa Giovanna Mulas* e il *Prof. Saturnino Spiga* per l'importante collaborazione stabilitasi in questi anni e per il supporto fornitomi.

Questo lavoro di tesi è stato possibile grazie al contributo della “*Fondazione Banco di Sardegna*” nell'ambito del progetto: “Studio del ruolo della componente genetica interindividuale nello sviluppo di disturbi impulsivo-compulsivi nella Malattia di Parkinson” (prat. 2013.1332).

Introduzione	pag 1
La Malattia di Parkinson	pag 1
<i>Epidemiologia</i>	pag 1
<i>Eziologia</i>	pag 2
<i>Segni e sintomi</i>	pag 4
<i>Terapia</i>	pag 7
Pramipexolo: aspetti chimici, farmaceutici e biologici	pag 12
Disturbi del comportamento associati alla terapia dopaminergica sostitutiva	pag 18
<i>Generalità</i>	pag 18
<i>La sindrome da disregolazione dopaminergica e il gioco d'azzardo</i>	pag 19
<i>Basi neurali</i>	pag 21
<i>I ratti inbred Lewis e Fischer 344 come modello per lo studio delle dipendenze</i>	pag 23
Pramipexolo: aspetti motivazioni, dipendenza ed impulsività	pag 26
<i>I recettori D₃ nella malattia di Parkinson</i>	pag 28
<i>I recettori D₃ nelle discinesie</i>	pag 30
<i>I recettori D₃ nelle dipendenze</i>	pag 33
Scopo della ricerca	pag 35
Materiali e metodi	pag 37
Animali	pag 37
Effetti antiparkinsoniani del pramipexolo	pag 37
<i>Lesione unilaterale nel fascio mediale del mesencefalo</i>	pag 37
<i>Valutazione del comportamento rotatorio</i>	pag 39
<i>Valutazione immunoistochimica del c-fos</i>	pag 41
Proprietà gratificanti del pramipexolo	pag 42
<i>Lesione bilaterale dello striato dorso laterale</i>	pag 42
<i>Impianto di cannule croniche nella shell del nucleus accumbens</i>	pag 43
<i>Il paradigma sperimentale della preferenza spaziale condizionata</i>	pag 44
<i>Immunoistochimica per la tirosina idrossilasi</i>	pag 46
Farmaci	pag 47
Valutazione statistica	pag 47
Risultati	pag 48
Effetti antiparkinsoniani del pramipexolo	pag 48
<i>Ruolo dei recettori dopaminergici D₁ sul turning controlaterale indotto dal pramipexolo e sull'immunoreattività al c-fos</i>	pag 48
<i>Ruolo dei recettori dopaminergici D₂ sul turning controlaterale indotto dal pramipexolo</i>	pag 50
<i>Ruolo dei recettori dopaminergici D₃ sul turning controlaterale indotto dal pramipexolo</i>	pag 52
<i>Ruolo della sensibilizzazione indotta dalla levodopa sul turning controlaterale indotto dal pramipexolo</i>	pag 53
Proprietà gratificanti del pramipexolo	pag 55
<i>Influenza del fenotipo sull'espressione della preferenza spaziale condizionata indotta dal pramipexolo in ratti con lesione bilaterale dello striato dorso-laterale con 6-OHDA</i>	pag 55

<i>Pramipexolo e preferenza spaziale condizionata: della shell del nucleus accumbens</i>	pag 56
<i>Valutazione della lesione striatale: l'analisi della tirosina idrossilasi</i>	pag 58
Discussione	pag 60
<i>Effetti antiparkinsoniani del pramipexolo</i>	pag 60
<i>Proprietà gratificanti del pramipexolo</i>	pag 64
Bibliografia	pag 68